



**Cátia Sofia Domingues
Oliveira**

**Prospecção de compostos bioativos nas
macroalgas *Himanthalia elongata*, *Laminaria
ochroleuca* e *Undaria pinnatifida***



**Cátia Sofia Domingues
Oliveira**

**Prospecção de compostos bioativos nas
macroalgas *Himanthalia elongata*, *Laminaria
ochroleuca* e *Undaria pinnatifida***

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre, Professor associado com agregação do Departamento Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Sónia Andreia Oliveira Santos investigadora pós-doc do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais e avós.

o júri

presidente

Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor auxiliar da Universidade de Aveiro

Doutor Armando Jorge Domingues Silvestre
Professor associado da Universidade de Aveiro

Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso
Investigadora de pós-doutoramento da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Aos meus orientadores Prof. Doutor Armando Silvestre e Doutora Sónia Santos pela orientação, disponibilidade e conhecimentos cedidos ao longo deste trabalho.

À Doutora Carla Vilela pela ajuda, disponibilidade e orientação prestada.

Ao grupo de investigação LignoMacro pelo excelente ambiente de trabalho e por todas as pequenas ajudas que tornaram este percurso mais fácil.

Aos amigos pelo companheirismo, paciência, pela amizade e pelos bons momentos de descontração. Um especial agradecimento à Selesa e à Sté pelo apoio, pelos conselhos e pela companhia diária que tornaram dias piores em melhores.

Ao Helder pela paciência inesgotável, pela compreensão e por todo o apoio incondicional, por acreditar em mim e por me fazer acreditar que tudo se consegue.

E por último, agradeço à minha família, em particular aos meus pais, pelo apoio, pela paciência e pela confiança depositada em mim. Aos meus avós, pela força que me continuam a dar através dos pensamentos e das lembranças.

palavras-chave

Algas castanhas, compostos bioativos, *Himanthalia elongata*, *Laminaria ochroleuca*, *Undaria pinnatifida*, atividade antioxidante

resumo

O presente trabalho teve como principal objetivo caracterizar os metabolitos secundários, compostos lipofílicos e compostos mais polares, de três macroalgas existentes na costa portuguesa, nomeadamente da *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*, de forma a contribuir para a sua valorização. Foram realizadas extrações Soxhlet com diclorometano para extrair os compostos lipofílicos, enquanto as frações mais polares foram obtidas por extrações convencionais sólido-líquido, usando diferentes misturas de solventes (acetona:H₂O e metanol:H₂O:AcOH). Os extratos foram analisados por GC-MS e HPLC-MS. Os extratos polares foram ainda avaliados quanto à sua atividade antioxidante e quanto ao teor de fenóis totais (método de Folin-Ciocalteu) e florotaninos (método DMBA). A fração lipofílica das três macroalgas estudadas é composta principalmente por ácidos gordos, álcoois alifáticos de cadeia longa e esteróis. O ácido hexadecanóico mostrou ser o composto maioritário das três espécies de algas, seguido dos ácidos octadecanóico e tetradecanóico. O fucosterol foi o esteroide mais abundante encontrado para a *H. elongata*, enquanto que na *L. ochroleuca* e na *U. pinnatifida* foi o 24-metilenocolesterol. Os extratos polares obtidos a partir das duas metodologias de extração apresentaram rendimentos de extração elevados, tendo os extratos acetona:H₂O apresentado rendimentos de extração superiores (88.73-92.33 %). Estes extratos mostraram ainda teores de fenóis e florotaninos totais mais elevados, com valores entre 524.03-635.69 g EAG/kg de peso seco e 1.48-1.55 g EFG/kg de peso seco, respetivamente. Os extratos de acetona:H₂O no ensaio DPPH apresentaram valores de IC₅₀ entre 6.57-7.64 µg/mL. Estes valores, apesar de serem inferiores ao IC₅₀ do ácido ascórbico, são superiores ao determinado para o antioxidante sintético butil-hidroxitolueno (BHT). O extrato da acetona:H₂O da *L. ochroleuca* foi o que apresentou melhor atividade antioxidante, com um IC₅₀ de 6.57 ± 0.71 µg/mL. A análise por HPLC-DAD-MSⁿ não permitiu até ao momento detetar compostos fenólicos nos extratos obtidos. Estes resultados são uma contribuição relevante para a valorização destas espécies de macroalgas como fonte de fitoquímicos valiosos.

keywords

Brown algae, bioactive compounds, *Himanthalia elongata*, *Laminaria ochroleuca*, *Undaria pinnatifida*, antioxidant activity.

abstract

This study aimed to characterize the secondary metabolites, lipophilic and more polar compounds, of three existing macroalgae in the Portuguese coast, namely *H. elongata*, *L. ochroleuca* and *U. pinnatifida*, in order to make them more valuable. Soxhlet extractions were performed with dichloromethane in order to extract lipophilic compounds, while polar fraction were obtained by conventional solid-liquid extractions using different solvent mixtures (acetone:H₂O and methanol:H₂O:AcOH). The extracts were analyzed by GC-MS and HPLC-MS. Polar extracts were also evaluated for their antioxidant activity and their phenol content (Folin-Ciocalteu method) and florotaninos (DMBA method). The lipophilic fraction from the three macroalgae studied is composed mainly of fatty acids, long chain aliphatic alcohols and sterols. Hexadecanoic acid was the major compound detected in the three species of algae, followed by octadeca-9-enoic and tetradecanoic acids. Fucosterol was the most abundant sterol found in *H. elongata*, while in *L. ochroleuca* and *U. pinnatifida* was 24-methylene-cholesterol. Polar extracts from both extraction methodologies showed even higher extraction yields, the acetone:H₂O extracts presented the higher extraction yields (88.73 - 92.33%). These extracts also showed higher levels of total phenols and phlorotannins content, ranging from 524.03-635.69 g EAG/kg dry weight and 1482.05-1552.75 mg PGE/kg dry weight, respectively. Acetone:H₂O extracts on the DPPH assay presented IC₅₀ values between 6.57-7.64 µg/mL, which are lower than the IC₅₀ of the ascorbic acid but higher than the determined for butylated hydroxytoluene a synthetic antioxidant (BHT). The acetone:H₂O extract of the *L. ochroleuca* showed the best antioxidant activity, with an IC₅₀ value of 6.57 ± 0.71 µg/mL. Analysis by HPLC-DAD-MSⁿ did not allowed to detect phenolic compounds in the obtained extracts.

These results are an important contribution to the valorization of these macroalgae species as a source of valuable phytochemicals.

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas.....	v
Símbolos e abreviaturas	vi
1. Objetivos	1
2. Introdução	3
2.1. Caracterização da flora algal.....	3
2.2. Enquadramento do sector algal português no mundo	4
2.2.1. Macroalgas na costa portuguesa.....	8
3. Composição química de macroalgas marinhas e os seus efeitos benéficos para a saúde	9
3.1. Metabolitos primários e secundários	9
3.1.1. Compostos lipofílicos.....	12
3.1.2. Compostos fenólicos	22
3.2. Composição química das macroalgas <i>H. elongata</i> , <i>L. ochroleuca</i> e <i>U. pinnatifida</i>	28
3.3. Efeitos benéficos para a saúde	34
3.3.1. Atividade antioxidante	36
3.3.1.1 Espécies reativas	37
3.3.1.2 Avaliação da atividade antioxidante.....	39
3.4. Métodos de extração e análise de compostos	40
3.4.1. Análise dos compostos por técnicas cromatográficas	42
4. Materiais e métodos	45
4.1. Amostras e reagentes	45
4.2. Extração de compostos lipofílicos	46
4.2.1. Hidrólise alcalina.....	46
4.2.2. Análise GC-MS	46

4.3.	Extração de compostos polares.....	47
4.3.1.	Quantificação do teor de fenóis totais (TPC)	48
4.3.2.	Ensaio 2,4-dimetoxibenzaldeído (DMBA).....	48
4.3.3.	Atividade antioxidante dos extratos polares – Ensaio DPPH	49
4.3.4.	Análise por HPLC-MS	50
4.3.5.	Análise por UV-Visível.....	51
4.3.6.	Análise por Ressonância magnética nuclear RMN de ^{13}C e ^1H	51
5.	Resultados e discussão.....	53
5.1.	Extração de compostos lipofílicos	53
5.1.1.	Rendimento global das extrações Soxhlet.....	53
5.1.2.	Identificação e quantificação dos extratos lipofílicos por GC-MS.....	54
5.1.2.1	Ácidos gordos.....	58
5.1.2.2	Álcoois alifáticos de cadeia longa	63
5.1.2.3	Esteróis	64
5.2.	Extração de compostos polares.....	66
5.2.1.	Rendimento global das extrações de compostos polares.....	66
5.2.2.	Quantificação do teor de fenóis totais e florotaninos	67
5.2.3.	Atividade antioxidante	68
5.2.4.	Identificação de compostos polares.....	70
6.	Conclusões e trabalhos futuros	75
7.	Bibliografia	77
8.	Anexos	85

Índice de Figuras

Figura 1 – Número de espécies de algas em cada país registrado na base de dados <i>AlgaeBase</i> até à data 5 de Dezembro de 2015 (14).	5
Figura 2 – Consumo de algas marinhas a nível mundial. [Adaptado de: (18)].	7
Figura 3 – Principais vias do metabolismo responsáveis pela biossíntese de alguns metabolitos primários e secundários (adaptado de (30,31)).	10
Figura 4 – Estrutura dos ácidos gordos presentes em macroalgas.	14
Figura 5 – Representação dos gliceroglicolípidos presentes em macroalgas.	15
Figura 6 – Principais fosfolípidos presentes nas macroalgas.	16
Figura 7 – Estrutura geral de um triacilglicerol.	16
Figura 8 – Vias Mevalonato (MVA) e 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato/2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (DOXP/MEP). Abreviaturas da figura: HMG-CoA: 3-(S)-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, CDPME2P: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato, ME-cPP: 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-difosfato, HMBPP: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato (adaptado de: (31)).	18
Figura 9 – Diterpenos identificados em algas castanhas do género <i>Dictyota</i>	19
Figura 10 – Carotenóides e clorofilas existentes em macroalgas.	20
Figura 11 – Esteróis encontrados em macroalgas.	22
Figura 12 – Via xiquimato e síntese de compostos fenólicos pela via fenilpropanóide (Adaptado de: (29,53)).	23
Figura 13 – Alguns exemplos de ácidos e aldeídos fenólicos presentes em algas.	24
Figura 14 – Estrutura das diferentes subclasses flavonóides.	25
Figura 15 – Classificação de diferentes subclasses de taninos (adaptado de: (59)).	26
Figura 16 – Biossíntese do floroglucinol pela via etilo-malonato (adaptado de: (12)).	27
Figura 17 – Florotaninos derivados de macroalgas castanhas.	28
Figura 18 – Ilustração das macroalgas castanhas em estudo: A- <i>Himanthalia elongata</i> , B- <i>Laminaria ochroleuca</i> e C - <i>Undaria pinnatifida</i> (61).	29
Figura 19 – Exemplos de flavanóis presentes em macroalgas.	33
Figura 20 – Formação de ROS/RNS a partir dos radicais livres superóxido e óxido nítrico e um conjunto de reações subsequentes onde se formam metabolitos ainda mais reativos (Adaptado de: (76,79,81)).	38
Figura 21 – Mecanismo de reação entre o radical DPPH [•] e compostos antioxidantes (adaptado de: (83)).	40
Figura 22 – Esquema do sistema de extração Soxhlet (adaptado de: (94)).	41
Figura 23 – Cromatograma do extrato em diclorometano derivatizado da macroalga <i>H. elongata</i> . 55	
Figura 24 – Principais famílias de compostos lipofílicos identificados nos extratos em diclorometano das algas <i>H. elongata</i> , <i>L. ochroleuca</i> e <i>U. pinnatifida</i> . SFA – ácidos gordos saturados, UFA – ácidos gordos insaturados, LCCA – álcoois alifáticos de cadeia longa, ST – esteróis e MG – monoglicerídeos.	57
Figura 25 – Espectro de massa do derivado TMS do ácido hexadecanóico.	58
Figura 26 – Mecanismos de fragmentação do ião fragmento [M-15] ⁺ e dos iões a <i>m/z</i> 117, 129, 132 e 145.	60
Figura 27 – Espectro de massa do derivado TMS do ácido nonanedióico.	62
Figura 28 – Espectro de massa do derivado TMS hexadecan-1-ol.	63
Figura 29 – Mecanismo de fragmentação do ião a <i>m/z</i> 103 característico dos derivados de TMS de álcoois alifáticos primários.	64

Figura 30 – Espectro de massa do derivado TMS do fucosterol.....	65
Figura 31 – Cromatograma de HPLC-UV a 280 nm da macroalga <i>H. elongata</i> obtido a partir dos extratos acetona:H ₂ O e MeOH:H ₂ O:AcOH	70
Figura 32 – Espectro UV-Vis dos extratos acetona:H ₂ O para as algas <i>H. elongata</i> , <i>L. ochroleuca</i> e <i>U. pinnatifida</i>	71
Figura 33 – Espectro de RMN de ¹³ C do extrato acetona:H ₂ O da <i>L. ochroleuca</i>	72
Figura 34 – Espectro de RMN de ¹ H do extrato acetona:H ₂ O da <i>L. ochroleuca</i>	73
Figura 35 – Cromatograma do extrato em diclorometano derivatizado da macroalga <i>L. ochroleuca</i>	87
Figura 36 – Cromatograma do extrato em diclorometano derivatizado da macroalga <i>U. pinnatifida</i>	87

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Diferentes nomenclaturas de alguns ácidos gordos saturados e insaturados ω -3 e ω -6 encontrados em algas.	13
Tabela 2 – Classificação de compostos fenólicos (adaptado a partir de (52)).	23
Tabela 3 – Teor relativo de ácidos gordos (%) ^a nas macroalgas secas <i>H. elongata</i> , <i>L. ochroleuca</i> e <i>U. pinnatifida</i> (33).	31
Tabela 4 – Teor relativo de esteróis (%) nas macroalgas secas <i>H. elongata</i> , <i>L. ochroleuca</i> e <i>U. pinnatifida</i> (50).	32
Tabela 5 – Composição de compostos fenólicos nas macroalgas <i>H. elongata</i> , <i>L. ochroleuca</i> e <i>U. pinnatifida</i> (μ g/g de peso seco) (32).	33
Tabela 6 – Compostos biologicamente ativos isolados a partir de macroalgas.	34
Tabela 7 – Resumo de florotaninos encontrados em algas castanhas e as suas possíveis aplicações farmacológicas (adaptado de: (60)).	35
Tabela 8 – Macroalgas escolhidas e regiões da recolha.	45
Tabela 9 – Rendimentos de extração com diclorometano das macroalgas <i>H. elongata</i> , <i>L. ochroleuca</i> e <i>U. pinnatifida</i>	54
Tabela 10 – Compostos detetados nos extratos lipofílicos das macroalgas <i>H. elongata</i> , <i>L. ochroleuca</i> e <i>U. pinnatifida</i>	55
Tabela 11 – Rendimento das extrações acetona:água e metanol:água:ácido acético das macroalgas <i>H. elongata</i> , <i>L. ochroleuca</i> e <i>U. pinnatifida</i>	67
Tabela 12 – Quantificação do teor de fenóis totais e florotaninos dos extratos acetona:água e metanol:água:ácido acético das macroalgas <i>H. elongata</i> , <i>L. ochroleuca</i> e <i>U. pinnatifida</i>	68
Tabela 13 – Atividade antioxidante dos extratos acetona:água e metanol:água:ácido acético das macroalgas <i>H. elongata</i> , <i>L. ochroleuca</i> e <i>U. pinnatifida</i>	69
Tabela 14 - Espécies de macroalgas castanhas existentes ao longo da costa portuguesa (15,26).	85

Símbolos e abreviaturas

AACL ou LCCA	Álcoois alifáticos de cadeia longa
ABTS	Do inglês, <i>2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid)</i>
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácido gálico
ASE	Extração acelerada por solvente
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
C	Catequina
CAT	Catalase
CG	Catequina galato
CMK	CDP-ME cinase
COX	Ciclo-oxigenase
CTP	Citidina-5'-trifosfato
DAD	Detetor por arranjo de díodos
DAHPh	3-dioxi-D-arabino-heptulosonato- 7-fosfato
DGDG	Digalactosil-diacilglicerol
DMAPP	Dimetilalilo difosfato
DMBA	2,4-dimetoxibenzaldeído
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOXP	1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DXS	DOXP sintase
EAA	Equivalentes de ácido ascórbico
EAE	Extração assistida por enzimas
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EBHT	Equivalentes de butil-hidroxitolueno
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequina galato
EFG	Equivalentes de floroglucinol
EGC	Epigallocatequina
EGCg	Epigallocatequina galato
EPA	Ácido eicosapentanóico
FG	Floroglucinol
FRAP	Do inglês, <i>ferric reducing antioxidant power</i>
GAP	D-glicerealdeído-3-fosfato

GC-MS	Cromatografia de gasosa acoplada à espectrometria de massa
GL	Gliceroglicolípido
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
G3P	Glicerol-3-fosfato
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMBPP	1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato
HMG-CoA	3-(S)-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa
HPV	Vírus do papiloma humano
HSV	Vírus herpes simplex
IDI	Isopentenil-difosfato isomerase
IPP	Isopentenil-difosfato
KOH	Hidróxido de potássio
LNA	Ácido α -linolénico
MAE	Extração assistida por micro-ondas
MCT	CDP-ME sintase
MDS	ME-cPP sintase
ME-cPP	2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-difosfato
MEP	Via metil-D-eritritol 4-fosfato
MG	Monoglicerídeos
MGDG	Monogalactosil-diacylglicerol
MK	Mevalonato cinase
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MPO	Mieloperoxidase
MUFAs	Ácidos gordos mono-insaturados
MVA	Via do mevalonato
MVADP	Mevalonato-5-difosfato
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NAD(P)H-oxidase
ORAC	Capacidade de absorção do radical oxigénio
PA	Ácido fosfatídico
PAL	Fenilalanina amónia liase
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina

PEP	Fosfoenolpiruvato
PG	Fosfatidilglicerol
FG	Floroglucinol
Phe	Fenilalanina
PI	Fosfatidilinositol
PL	Fosfolípidos
PMK	Mevalonato-5-fosfato cinase
PPMD	Mevalonato-5-difosfato descarboxilase
PS	Fosfatidilserina
PUFAs	Ácidos gordos poli-insaturados
PPi	Pirofosfato inorgânico
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SDA	Ácido estearidónico
SFA	Ácidos gordos saturados
SFE	Extração por fluido supercrítico
SOD	Superóxido dismutase
SQDG	Sulfolípido sulfoquinovosil-diacilglicerol
ST	Esteróis
TAG	Triacilgliceróis
TBHQ	<i>tert</i> -butil-hidroquinona
TEAC	Do inglês, <i>trolox equivalents antioxidant capacity</i>
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetra-hidrofurano
TMS	Trimetilsililo
TMSCI	Trimetilclorossilano
TPC	Quantificação do teor de fenóis totais
TRAP	Do inglês, <i>total radical-trapping antioxidant parameter</i>
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UAE	Extração assistida por ultra-sons
UFA	Ácidos gordos insaturados
UV	Espetroscopia de ultra-violeta

1. Objetivos

Portugal possui uma zona económica exclusiva bastante extensa, sobre a qual têm sido criadas várias estratégias, de forma a impulsionarem um desenvolvimento económico baseado no conhecimento, na exploração sustentável e num uso mais eficiente dos recursos marinhos. A biotecnologia marinha tem sido um dos setores com maior crescimento, destacando-se a exploração de organismos marinhos como uma fonte de compostos de valor acrescentado, em particular de compostos biologicamente ativos (1). De facto, atualmente tem existido um elevado interesse neste tipo de compostos, que devido às suas inúmeras propriedades apresentam várias aplicações a nível industrial, nomeadamente na indústria farmacêutica, cosmética, entre outras (2).

Dentro dos recursos marinhos, as algas, embora sejam utilizadas na alimentação e como remédios tradicionais à vários séculos, são um recurso marinho ainda pouco explorado em Portugal, apesar de alguns estudos terem já demonstrado que estas podem ser uma fonte promissora de compostos bioativos (3,4).

A grande diversidade de espécies de algas presentes na costa portuguesa aliada à elevada variabilidade que estas apresentam na sua composição faz com que mais estudos tenham que ser feitos para a valorização destes recursos. Assim, definiram-se como objetivos para este trabalho:

- Identificar e quantificar compostos lipofílicos e polares a partir de macroalgas castanhas recolhidas na costa portuguesa: *Himanthalia elongata*, *Laminaria ochroleuca* e *Undaria pinnatifida*;
- Avaliar o teor de fenóis totais e de florotaninos totais e a atividade antioxidante dos extratos polares;
- Contribuir para a exploração das macroalgas da costa portuguesa de forma a valoriza-las economicamente (5).

2. Introdução

O planeta Terra apresenta cerca de 70% da sua superfície coberta pelos oceanos, a partir dos quais surgiu a vida na Terra à bilhões de anos (6). Os oceanos, contendo 97% da água do planeta, dominam a hidrosfera apresentando milhões de espécies. Compostos com potenciais atividades biológicas têm sido isolados a partir da flora e da fauna marítima (6,7). A procura de produtos naturais de origem marinha apenas se iniciou no final de 1970, até então, era uma área praticamente inexplorada. Devido à biodiversidade única que os oceanos apresentam esta tendência tem-se invertido e os recursos marinhos têm sido nos últimos anos alvo de estudos por parte de investigadores de várias áreas (químicos, bioquímicos, biólogos e farmacêuticos) (7,8). De facto, os organismos marinhos (algas, esponjas, fungos, cnidário, etc.) são uma potencial fonte de metabolitos secundários com atividades biológicas benéficas para a saúde e para a prevenção e tratamento de várias doenças (7,8). Entre os recursos marinhos, as algas, para além de fornecerem oxigénio para a biosfera e de serem alimento para peixes e humanos, têm demonstrado ser uma potencial fonte de metabolitos biologicamente ativos com várias aplicações na indústria alimentar, na cosmética e mais recentemente na indústria farmacêutica (8,9). Em todo o mundo, a pesquisa dos recursos marinhos tem revolucionado o mundo científico (7).

2.1. *Caracterização da flora algal*

O termo “alga” é utilizado para diferentes organismos que, em função da sua dimensão, são classificados em micro- ou macroalgas. As microalgas são organismos microscópicos que vivem em suspensão na água. As macroalgas são seres multicelulares com órgãos diferenciados, sendo encontradas habitualmente nas costas rochosas, quer em água doce, quer em água salgada. Estes organismos apresentam grande diversidade de tamanho, cor e forma, podendo encontrar-se como crostas na superfície das rochas, apresentando alguns milímetros de comprimento, ou em zonas eufóticas, isto é, zonas com maior profundidade (normalmente até 200 m), onde o limite inferior de penetração da luz é eficaz para a realização da fotossíntese. As macroalgas são ainda bentónicas, uma vez que se encontram fixas a sedimentos (normalmente rochosos) e podem apresentar tamanhos

gigantes (superiores a 50 metros), formando florestas aquáticas em algumas zonas costeiras (9–11).

As macroalgas apresentam colorações extremamente variadas, que se devem à combinação de diferentes pigmentos fotossintéticos presentes nas suas células e que estão na base da sua classificação em algas verdes, vermelhas e castanhas. Estes organismos marinhos pertencem ao domínio Eukaryota e a dois reinos distintos, ao reino Plantae onde estão inseridas as algas verdes e vermelhas e ao reino Chromista onde se encontram as algas castanhas (10,12).

As algas verdes estão incluídas no Filo Chlorophyta e apresentam pigmentação idêntica à das plantas terrestres, apresentando pigmentos fotossintéticos como a clorofila *a* e *b* e carotenóides como o β -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina e zeaxantina. As algas vermelhas pertencem ao Filo Rhodophyta e possuem clorofila *a* e carotenóides como o α -caroteno, β -caroteno, luteína, zeaxantina e ficobilinas. As algas castanhas estão incluídas no filo Ochrophyta, na classe Phaeophyceae e os seus pigmentos incluem as clorofilas *a* e *c* e carotenóides como o β -caroteno, violanxantina e fucoxantina, sendo este último o maioritário e responsável pela coloração acastanhada. Esta classificação está de acordo com proposta por Cavalier Smith (1998) (9,10,13).

Segundo a base de dados *AlgaeBase* (14), atualmente existem cerca de 37 812 espécies de algas, pertencentes ao domínio Eukaryota, sendo as Phaeophyceae cerca de 1 861, as Chlorophyta 5 812, as Rhodophyta 6 570, pertencendo as restantes a outros filós e classes.

2.2. *Enquadramento do sector algal português no mundo*

As algas marinhas habitam os oceanos à mais de 2 mil milhões de anos e apresentam uma ampla distribuição geográfica, variando no número de espécies consoante o país (Figura 1) (11).

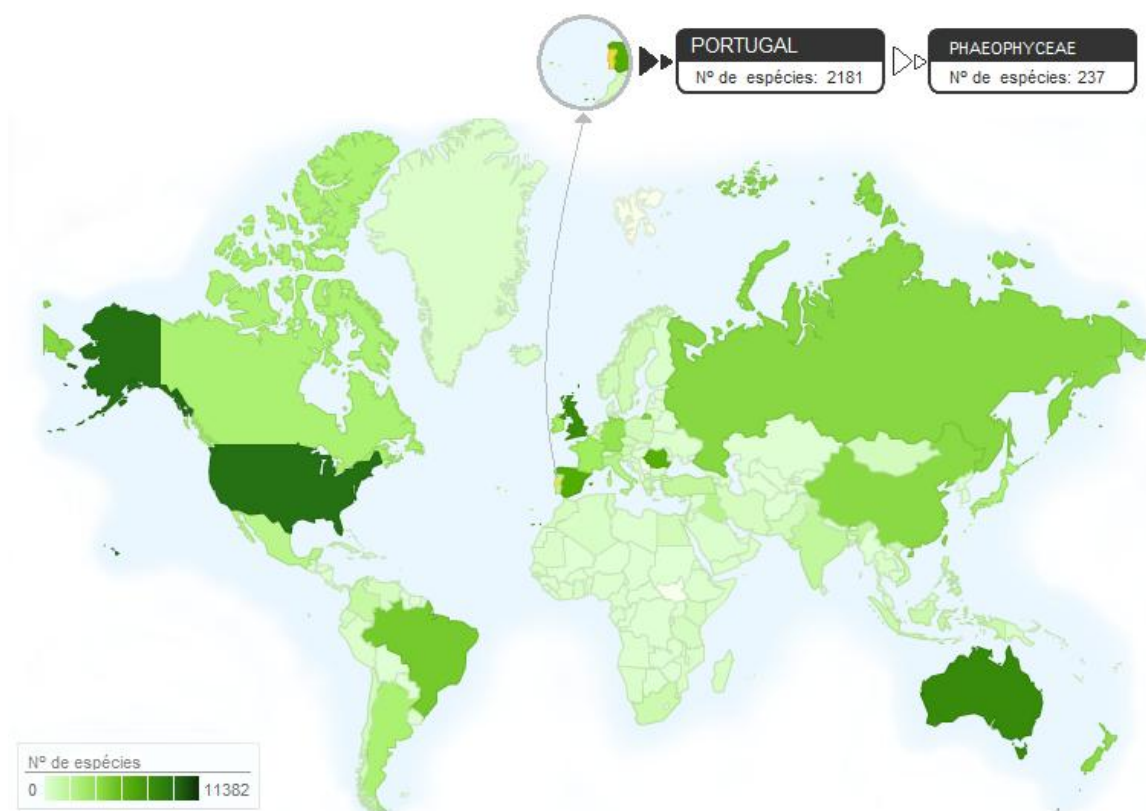


Figura 1 – Número de espécies de algas em cada país registrado na base de dados *AlgaeBase* até à data 5 de Dezembro de 2015 (14).

Portugal (continental) possui aproximadamente 830 quilómetros de costa com excelentes condições para o desenvolvimento da flora algal, apresentando uma diferente distribuição desta ao longo da costa (15). O litoral português encontra-se dividido em duas zonas costeiras, a zona do litoral Norte, que se estende desde a foz do rio Minho à foz do rio Tejo e que apresenta uma flora algal semelhante à zona central da Europa, e a zona a Sul, da foz do rio Tejo ao Algarve, com uma flora algal influenciada pelo Mediterrâneo e semelhante à zona Norte da costa ocidental africana (15). Apesar da diversidade marinha e da abundância de espécies de algas, este sector não se encontra muito desenvolvido comparativamente com outros países (15).

Na Ásia oriental a exploração e a utilização de algas como alimento é uma prática muito antiga, conhecida desde o século IV no Japão e desde o século VI na China (16). Estes dois países e a Coreia do Sul são os maiores consumidores de algas marinhas como

alimento (16). No entanto, nos últimos anos as algas têm sido usadas também para outros fins, tais como, fertilizantes e aplicações na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica (13,16)

Os países ocidentais, comparativamente à Ásia oriental, estão mais envolvidos na exploração de algas como uma fonte natural de ficocolóides (polissacarídeos de elevado peso molecular extraídos da parede celular de algas (17)) do que no seu consumo como alimento. A extração de ficocolóides tais como a carregenana, o agar e os alginatos deve-se às propriedades espessantes e gelificantes que estes polissacarídeos apresentam, podendo ser utilizados na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética (18). As carregenanas, por exemplo, são utilizadas na cosmética como agente de branqueamento, na alimentação (em pudins, gelados, gelatinas, geleias alimentares e leites achocolatados) e ainda em aplicações farmacêuticas, onde este ficocolóide tem apresentado um papel importante na redução do colesterol, no tratamento de úlceras gástricas, apresentando ainda atividade anti-tumoral, anti-inflamatória e anti-viral (inibe o desenvolvimento do vírus herpes simplex (HSV), a infeção pelo vírus do papiloma humano (HPV) e interfere com a fusão das células infetadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV)) (18). O agar, apesar de também ser muito utilizado em produtos alimentares, tem sido bastante procurado para fins biotecnológicos, sendo utilizado como meio de cultura de bactérias, microfungos, tecidos, microalgas, etc. Este polissacarídeo tem sido também usado em técnicas de separação, tais como, cromatografia e eletroforese, de forma a separar macromoléculas (por exemplo proteínas) e sequenciação de DNA, respetivamente (18). Por último, o alginato é também utilizado na área farmacêutica e cosmética, como excipiente de medicamentos e pode ainda ser impregnado em compressas e ligaduras para queimaduras, ajudando na cicatrização, e como agente de neutralização de metais pesados e radioativos em caso de intoxicação (18). Apesar dos ficocolóides presentes nas algas apresentarem diversas aplicações, mais de 50% do seu consumo a nível mundial destina-se à alimentação direta (Figura 2) (13,18).

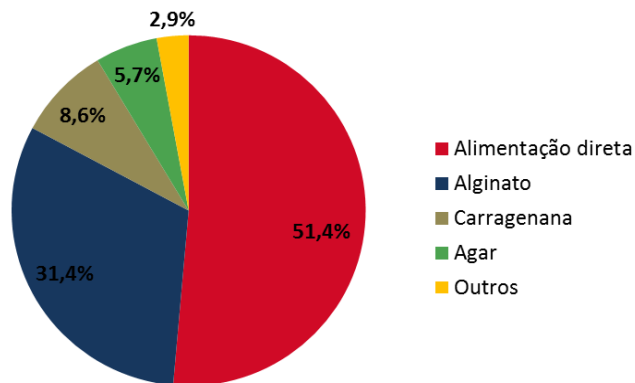


Figura 2 – Consumo de algas marinhas a nível mundial. [Adaptado de: (18)].

Nos últimos 50 anos houve um aumento do consumo de algas a nível mundial, que conduziu ao desenvolvimento de indústrias de cultivo, uma vez que os *stocks* naturais não conseguiam satisfazer a procura. Este aumento do consumo de algas deveu-se maioritariamente à emigração de asiáticos para outras partes do mundo, como os EUA e a América do Sul, introduzindo as algas na alimentação dos países de destino (16). No ano 2000 a produção de algas selvagens, juntamente com as de cultivo, atingiu cerca de 10 milhões de toneladas, sendo os principais países produtores a China, Japão, França, Reino Unido, Chile, Filipinas, Coreia do sul, Indonésia, Noruega, EUA, Canadá e Irlanda (13).

Em Portugal, a exploração de algas marinhas ainda está pouco desenvolvida (15) apesar da apanha de algas ser uma atividade muito antiga, descrita desde o século XIV e regulamentada em 1308 pelo rei D. Dinis. A apanha do sargaço (conjunto de diversas algas marinhas: *Saccorhiza*, *Laminaria*, *Fucus*, *Codium*, *Palmaria*, *Gelidium* e *Chondrus* utilizadas na agricultura) é ainda praticada em Portugal (18), no entanto, esta prática quase desapareceu devido à sua substituição por fertilizantes químicos (16). A indústria de agar português teve também sucesso a nível mundial, devido à abundância e qualidade das algas, no entanto, a incapacidade de diversificar e de apostar na qualidade, juntamente com a conjuntura internacional desfavorável causou a regressão desta indústria, levando praticamente ao seu desaparecimento (18).

Nos últimos anos, em Portugal, têm sido feitos alguns estudos na busca de compostos bioativos a partir de macroalgas presentes na costa portuguesa (3,4,19,20). De facto, as algas sobrevivem em habitats complexos, sujeitas a condições meteorológicas extremas,

dada a sua capacidade de desenvolver mecanismos de defesa, através da produção de uma grande variedade de metabolitos secundários (21,22).

2.2.1. Macroalgas na costa portuguesa.

Existem na literatura vários estudos de caraterização da flora algal portuguesa feita por ficologistas que identificaram inúmeras espécies (10,23–26).

Ardre (23,24) estudou exaustivamente entre 1961 a 1970 a flora algal portuguesa, identificando e descrevendo 246 espécies Rhodophyta, 98 Ochrophyta e 60 Chlorophyta. Estes números foram corroborados posteriormente por Sousa-Pinto (25).

Em 2009, Araújo *et al.* (26) baseado em referências bibliográficas, novos registos e também em dados de herbários, publicou uma lista atualizada de algas marinhas bentónicas do litoral norte da costa portuguesa, que compreende um total de 346 espécies (26 cianobactérias, 200 Rhodophyta, 70 Ochrophyta e 50 Chlorophyta) (26). Neste estudo, os autores concluíram que a região do Minho é a que apresenta maior número de espécies (306 espécies, 59 Ochrophyta), o Douro Litoral tem uma riqueza de espécies intermédia (233 espécies, 44 Ochrophyta) e a beira-litoral tem o menor número (202 espécies, 31 Ochrophyta). Verificou-se assim uma diminuição da distribuição algal de Norte para Sul de Portugal (26).

3. Composição química de macroalgas marinhas e os seus efeitos benéficos para a saúde

A composição química das macroalgas varia consoante a espécie, estação e habitat. As algas são conhecidas por serem um alimento nutritivo com poucas calorias, sendo constituídas, maioritariamente, por proteínas, lípidos, hidratos de carbono, compostos fenólicos, vitaminas e sais minerais (12,27). Elas contêm cerca de 80-90% de água e o seu peso seco contém cerca de 50% de hidratos de carbono, 1-3% de lípidos e ainda 7-38% de minerais. Relativamente ao seu conteúdo em proteínas, a percentagem é bastante variável, rondando os 10-47%, apresentando ainda quantidades elevadas de aminoácidos essenciais. O teor de fibra dietética (hidratos de carbono que não são digeridos pelo trato gastrointestinal) nas macroalgas varia entre 33-50 g/100g de peso seco de alga (27). A parede celular das algas é constituída principalmente por celulose, ulvano, alginato, fucoidanos, laminarina, carragenana e agar. O polissacarídeo ulvano é característico das algas verdes, os alginatos, fucoidanos e as laminarinas das algas castanhas, enquanto que a carragenana e o agar são típicos das algas vermelhas (13,28). As algas são ainda uma fonte de vitaminas solúveis (vitamina B, B2, B3, B5, B12, C) e insolúveis (vitamina A, E, D e K) e de minerais (Ca, Na, K, S, I, Mg, Fe, Zn, Mn, etc.) (12,27).

3.1. Metabolitos primários e secundários

As macroalgas, tal como todos os outros organismos, precisam de transformar e sintetizar um grande número de compostos orgânicos necessários para o seu crescimento e reprodução. A produção destes compostos dá-se através de um conjunto de reações químicas, mediadas e reguladas por enzimas, que necessitam de energia na forma de ATP. Estas reações ocorrem sequencialmente e encontram-se organizadas em vias metabólicas (Figura 3) (29). As vias que envolvem a síntese e a modificação de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies (hidratos de carbono, proteínas, gorduras e ácidos nucleicos) são comuns a todos os organismos, apresentando apenas pequenas variações e constituem o denominado metabolismo primário, sendo os compostos envolvidos descritos como metabolitos primários. Já os compostos sintetizados por outras vias e que,

aparentemente, não são essenciais para a sobrevivência das espécies são denominados por metabolitos secundários, fazendo parte do metabolismo secundário. Estes compostos biologicamente ativos apresentam uma distribuição mais limitada na Natureza, isto é, apenas são biossintetizados por organismos específicos (29).

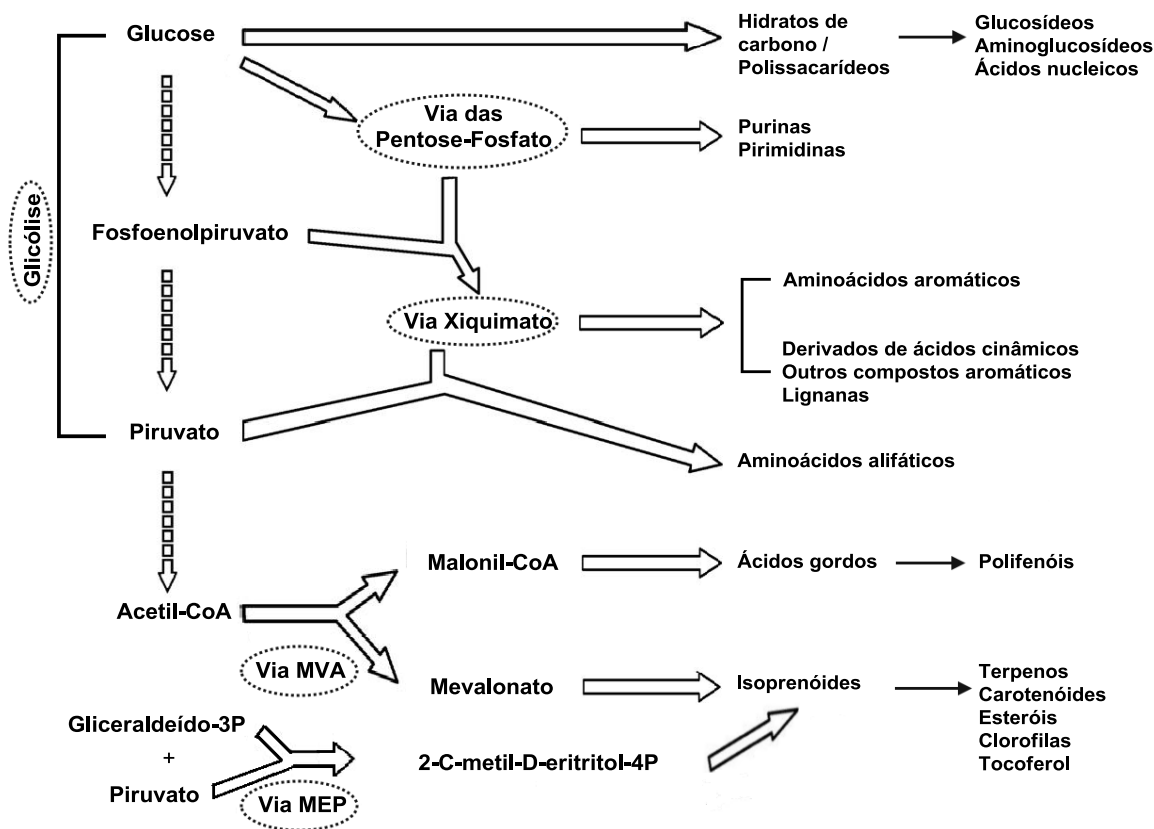


Figura 3 – Principais vias do metabolismo responsáveis pela biossíntese de alguns metabolitos primários e secundários (adaptado de (30,31)).

A produção de metabolitos secundários nas algas varia consoante a espécie, o *habitat* e as condições ambientais (32,33), tendo um papel essencial na proteção contra o *stress* abiótico e biótico (34). Estes metabolitos, apesar de não serem fundamentais para a sobrevivência dos organismos, apresentam um papel vital para o seu bem-estar (29). Uma das funções associadas aos metabolitos sintetizados pelas algas é promover mecanismos de defesa contra agentes patogénicos e predadores, como os animais de pasto marinho (8,35–37). O diterpeno clorodesmina, por exemplo, presente na macroalga *Chlorodesmis fastigiata*, tem como função dissuadir os peixes de consumirem esta alga (38). Também a libertação de toxinas por algas tem sido vista como uma forma de defesa, uma vez que,

quando ingeridas por animais e humanos pode causar efeitos nocivos ou mesmo letais (7,17). Um exemplo deste tipo de compostos os manauelalides encontrados na alga vermelha *Gracilaria coronopifolia*. Estas toxinas foram descritas como as responsáveis por intoxicações alimentares ocorridas no Havaí (39). Os metabolitos secundários permitem ainda às algas resistirem e sobreviverem a mudanças de temperatura, salinidade, condições extremas de nutrientes e radiação ultra-violeta (UV) (21).

As algas, sendo organismos fotossintéticos, são expostas a elevadas concentrações de luz e oxigénio, o que leva à formação de radicais livres, podendo induzir ao *stress* oxidativo (21,22). As espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) formam-se na membrana fotossintética e, consequentemente, podem causar danos oxidativos em diferentes componentes celulares, incluindo lípidos de membrana, proteínas, ácidos nucleicos e clorofilas (40). A ausência de danos estruturais (ou danos fotodinâmicos) sugere que estes organismos apresentam estratégias de defesa, através da produção de uma grande variedade de metabolitos secundários que os protege da oxidação (21,22). De facto, como forma de controlarem os níveis de ROS e protegerem as suas células, as algas apresentam compostos antioxidantes enzimáticos (Ex: superóxido dismutase, glutatona redutase, ascorbato peroxidase e catalase) e não enzimáticos (Ex: vitamina C ou ácido ascórbico, compostos fenólicos, glutatona, tocoferóis, carotenóides) (40).

Alguns dos metabolitos secundários sintetizados pelas algas, podem desempenhar benefícios para a saúde humana (21). Alguns destes compostos serão referidos ao longo deste estudo. Nos últimos anos, têm sido vários os estudos publicados sobre a identificação e caracterização de compostos bioativos em algas em busca de novos compostos biologicamente ativos que apresentem potenciais benefícios no combate a doenças como o cancro, alergias, *stress* oxidativo, inflamação, obesidade, trombose, doenças neurodegenerativas, entre outras (21,41,42). O aumento do número de estudos sobre os compostos bioativos presentes em alimentos/plantas levou também ao aparecimento do conceito de “alimento funcional”. Um alimento só é considerado funcional caso apresente, para além dos efeitos nutritivos, benefícios em uma ou mais funções fisiológicas, aumentando o bem-estar e diminuindo o risco do aparecimento ou desenvolvimento de doenças, respeitando o consumo das doses diárias recomendadas (21,41). Alguns alimentos

como o chocolate, chá verde, produtos láteos fermentados, algumas frutas e também as algas, são exemplos de alimentos funcionais (21).

Compostos isolados de algas têm demonstrado ter várias atividades biológicas, nomeadamente atividade anti-bacteriana, anti-hipertensiva, anti-viral, anticancerígena e antioxidante, etc. (21). Estes compostos poderão substituir, por exemplo, os antioxidantes sintéticos (butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno de (BHT) e *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ)) que, apesar de ainda serem muito utilizados em produtos alimentares, têm demonstrado alguns efeitos nocivos para a saúde, nomeadamente, efeitos tóxicos, cancerígenos e ainda efeitos anormais em sistemas enzimáticos (43–45). Os antioxidantes BHA e BHT têm também sido suspeitos de serem responsáveis por danos no fígado (45).

As macroalgas castanhas, classe de algas escolhida para este estudo, são quimicamente compostas por polissacarídeos, proteínas, apresentando ainda um baixo teor de lípidos ricos em ácidos gordos poli-insaturados, esteróis, carotenóides característicos (fucoxantina e xantofilas) e também alguns polifenóis, nomeadamente os florotaninos (compostos característico das algas castanhas) (32,43,46). Destas diferentes classes de compostos referidas anteriormente, os compostos lipofílicos e polares (em especial os compostos fenólicos) têm apresentado um interesse particularmente maior, essencialmente devido às várias propriedades biológicas a que têm sido associados, motivo pelo qual, estas famílias de compostos serão estudadas em detalhe neste estudo (3,32,33).

3.1.1. Compostos lipofílicos

Os compostos lipofílicos extraídos a partir das algas são essencialmente ácidos gordos, lípidos, terpenos (carotenóides) e esteróis. O conteúdo de lípidos totais em algas varia consoante a espécie, a localização, a estação, a temperatura, a intensidade de luz e a salinidade (40). Em algas castanhas o teor de lípidos totais normalmente é inferior a 4% de peso seco (33), no entanto, um estudo recente (47) relatou um teor de 15% de peso seco para a espécie *Sargassaceae*, colhida na Primavera no Oceano Pacífico norte.

As macroalgas apresentam uma grande variedade de ácidos gordos e em particular ácidos gordos poli-insaturados, em comparação com as plantas terrestres. Estruturalmente, os ácidos gordos são ácidos carboxílicos alifáticos de cadeia longa cujo número de

carbonos pode variar entre C12 e C24, podendo ser ainda lineares ou ramificados e saturados ou insaturados (12). A classificação destes compostos em mono-insaturados – MUFAs (do inglês *monounsaturated fatty acids*) e poli-insaturados – PUFAs (do inglês *polyunsaturated fatty acids*) depende do número de ligações duplas. Os ácidos gordos podem ser classificados pelo nome IUPAC, pelo nome trivial ou pela nomenclatura ómega (Tabela 1) (12).

Tabela 1 – Diferentes nomenclaturas de alguns ácidos gordos saturados e insaturados ω -3 e ω -6 encontrados em algas.

<i>Número de C:insaturações</i>	<i>Nome trivial</i>	<i>Nomenclatura ómega</i>	<i>IUPAC</i>
16:0	Ácido palmítico	ND	Ácido hexadecanóico
18:3n-3	Ácido α -linolénico	ω -3	Ácido 9Z,12Z,15Z-octadecatrienóico
18:4n-3	Ácido estearidónico	ω -3	Ácido 6Z,9Z,12Z,15Z-octadecatetraenóico
20:4n-6	Ácido araquidónico	ω -6	Ácido 5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenóico
20:5n-3	Ácido eicosapentanóico	ω -3	Ácido 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenóico

As algas castanhas geralmente apresentam um elevado conteúdo de PUFAs ω -3 (ω -3) e ω -6 (ω -6), onde o ácido eicosapentanóico (EPA, 20:5n-3), o ácido estearidónico (SDA, 18:4n-3) e o ácido α -linolénico (LNA, 18:3n-3) são os principais ω -3, e o ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) é o principal ω -6 (Figura 4) (40). O ácido palmítico tem sido descrito como o ácido gordo saturado mais abundante em macroalgas (33). Os PUFAS ω -3 têm demonstrado efeitos benéficos na saúde, tais como, redução de doenças cardíacas, trombose e aterosclerose (33).

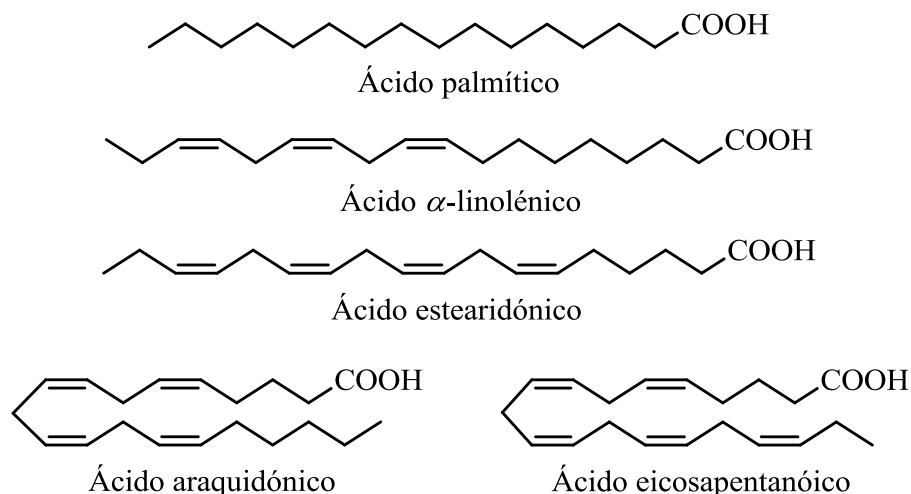


Figura 4 – Estrutura dos ácidos gordos presentes em macroalgas.

As classes de lípidos mais comuns nas algas são os gliceroglicolípidos (GL), os fosfolípidos (PL), os triacilgliceróis (TAG), esteróis e carotenóides (40). Estruturalmente os GL, PL e TAG possuem ácidos gordos esterificados com cadeias carbonadas mais longas e com maior grau de insaturação do que as plantas superiores (12).

Os gliceroglicolípidos encontram-se predominantemente nas membranas fotossintéticas das plantas/algas e são constituídos por uma molécula de glicerol, derivada do glicerol-3-fosfato (G3P), à qual estão esterificados dois ácidos gordos na posição -1 e -2 e um mono- ou um oligossacarídeo na posição -3 (12). Os GL presentes em algas são os monogalactosil-diacilglicerois (MGDG), digalactosil-diacilglicerois (DGDG) e os sulfolípidos sulfoquinovosil-diacilglicerois (SQDG) (Figura 5) (12,40). Em algas castanhas os glicolípidos SQDGs têm sido descritos como os mais abundantes, com teores entre 36,8 a 48,8 % (12). Os SQDGs têm como grupo substituinte, na posição -6 do monossacarídeo, um grupo sulfunato que lhe confere carga negativa, enquanto que os MGDGs e os DGDGs não têm carga a pH fisiológico e, estruturalmente, possuem uma e duas moléculas de galactose, respetivamente. Estes GLs apresentam elevado conteúdo de PUFA ω -3 porém, em algas castanhas os DGDGs são os que apresentam maior número insaturações e os SQDGs são os mais saturados. Os MGDGs e DGDGs apresentam como principais ácidos gordos esterificados o ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentanóico (EPA), ácido α -linolénico (LNA) e ácido estearidónico (SDA) enquanto os SQDGs apresentam o ácido palmítico e o ácido oleico (18:2n-6) (12).

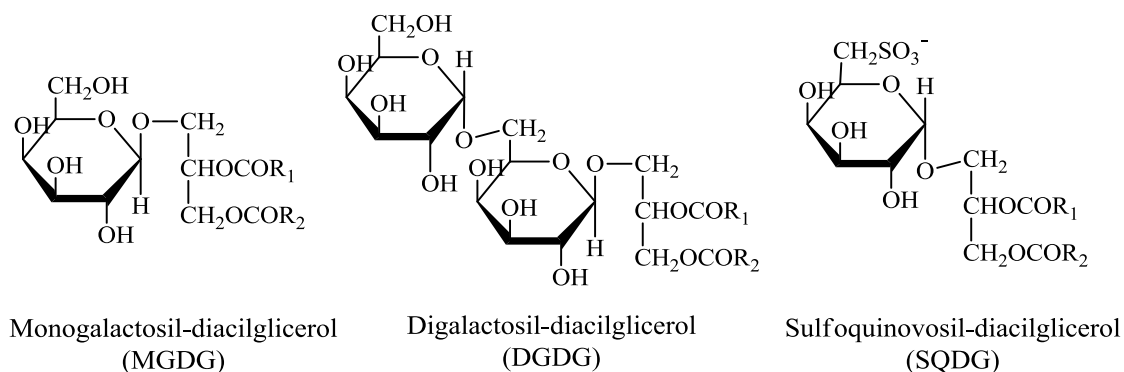


Figura 5 – Representação dos gliceroglicolípidos presentes em macroalgas.

Os fosfolípidos (PL) representam cerca de 10 a 20 % dos lípidos totais em algas, sendo essenciais para manter a integridade estrutural e a permeabilidade das membranas devido à sua natureza anfifílica. Estruturalmente, estes compostos são constituídos por uma molécula de glicerol, esterificada nas posições -1 e -2, contendo na posição -3 um grupo fosfato, à qual se liga um grupo hidrofílico responsável pela classificação da molécula (12).

Os PLs presentes nas algas são os fosfatidilglicerois (PG), as fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas (PS), fosfatidilinositois (PI) e o ácido fosfatídico (PA) (Figura 6) (12). Nas algas castanhas as fosfatidilcolinas (PC) e fosfatidiletanolaminas (PE) são descritas como os PLs mais abundantes, apresentando entre 11,3 a 29,3% de fosfolípidos (12).

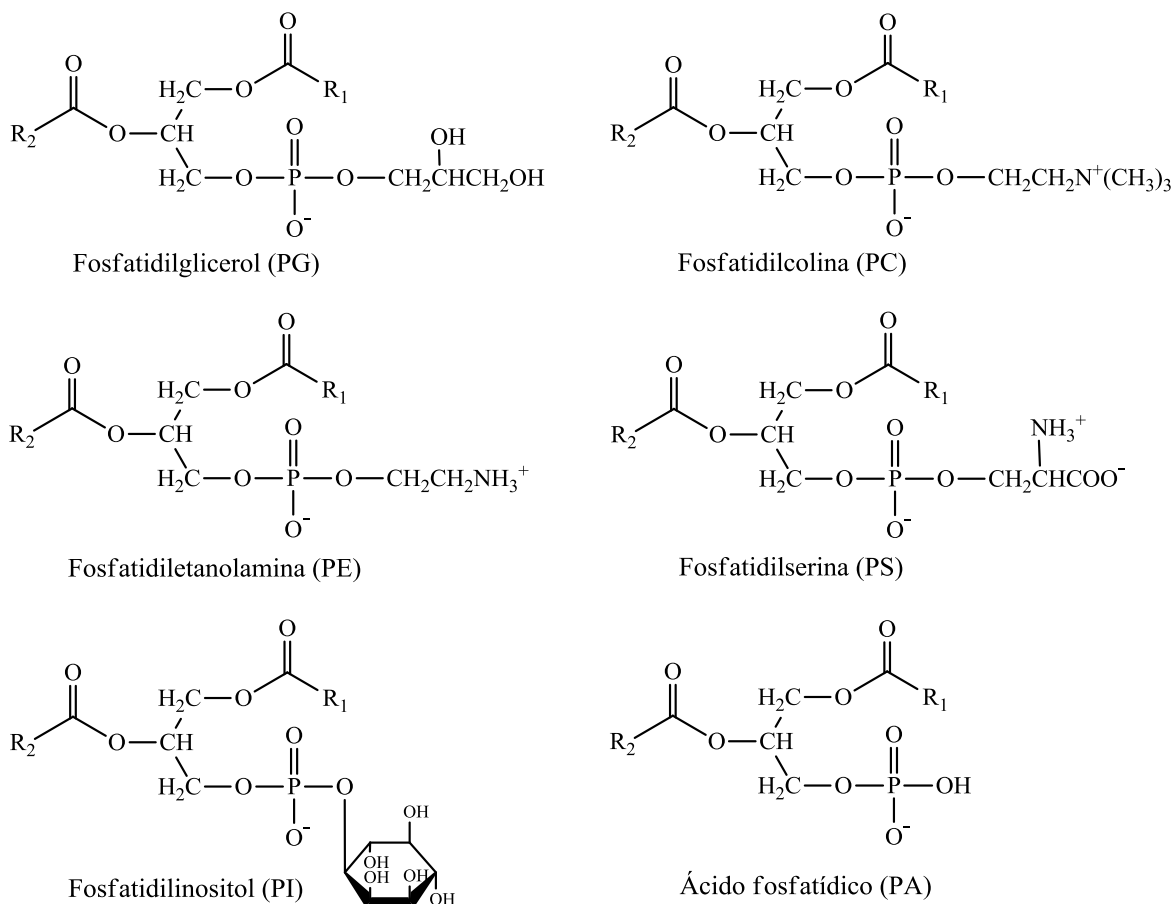


Figura 6 – Principais fosfolípidos presentes nas macroalgas.

Os triacilgliceróis (TAG), tal como o nome indica, possuem na sua estrutura uma molécula de glicerol esterificada com ácidos gordos na posição -1, -2 e -3 (Figura 7). Os TAGs são os lípidos neutros que mais prevalecem em algas, no entanto a sua percentagem é bastante variável podendo apresentar valores entre 1 a 97%. Estes compostos têm como principal função o armazenamento de energia (12).

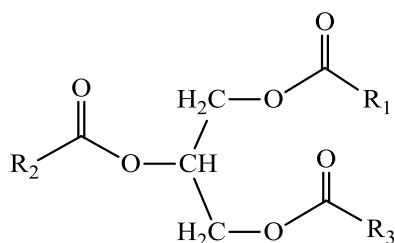


Figura 7 – Estrutura geral de um triacilglicerol.

Os terpenos são metabolitos secundários constituídos por unidades de isopreno (C_5H_8) que são biossintetizados a partir de duas vias, a via do mevalonato (MVA), que ocorre nos citoplasmas e/ou a via 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato/2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (DOXP/MEP) (31), que tem lugar nos plastídios. Consoante o número de unidades de isopreno os terpenos são classificados em homo-, mono-, sesqui-, di-, sester-, tri-, tetra- e politerpeno apresentando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e >8 unidades isoprénicas, respetivamente. Alguns terpenos apresentam grupos funcionais específicos, como por exemplo grupos hidroxilo, carbonilo, carboxilo e funções éster, sendo designados, neste caso, por terpenóides (43,48).

A biossíntese de isoprenóides inicia-se com duas unidades de isopreno, o isopentenil-difosfato (IPP) e o dimetilalilo difosfato (DMAPP). Na via MVA, o IPP é formado a partir da condensação de três moléculas de acetil-CoA enquanto que, na via DOXP/MEP os IPP/DMAPP são formados a partir dos intermediários piruvato e D-glicerealdeído-3-fosfato (GAP) formando DOXP, que em seguida sofre um rearranjo intramolecular e uma redução, originando MEP (Figura 8). Os isoprenóides obtidos são essenciais para o desenvolvimento, sobrevivência e interação com o ambiente circundante das algas (31).

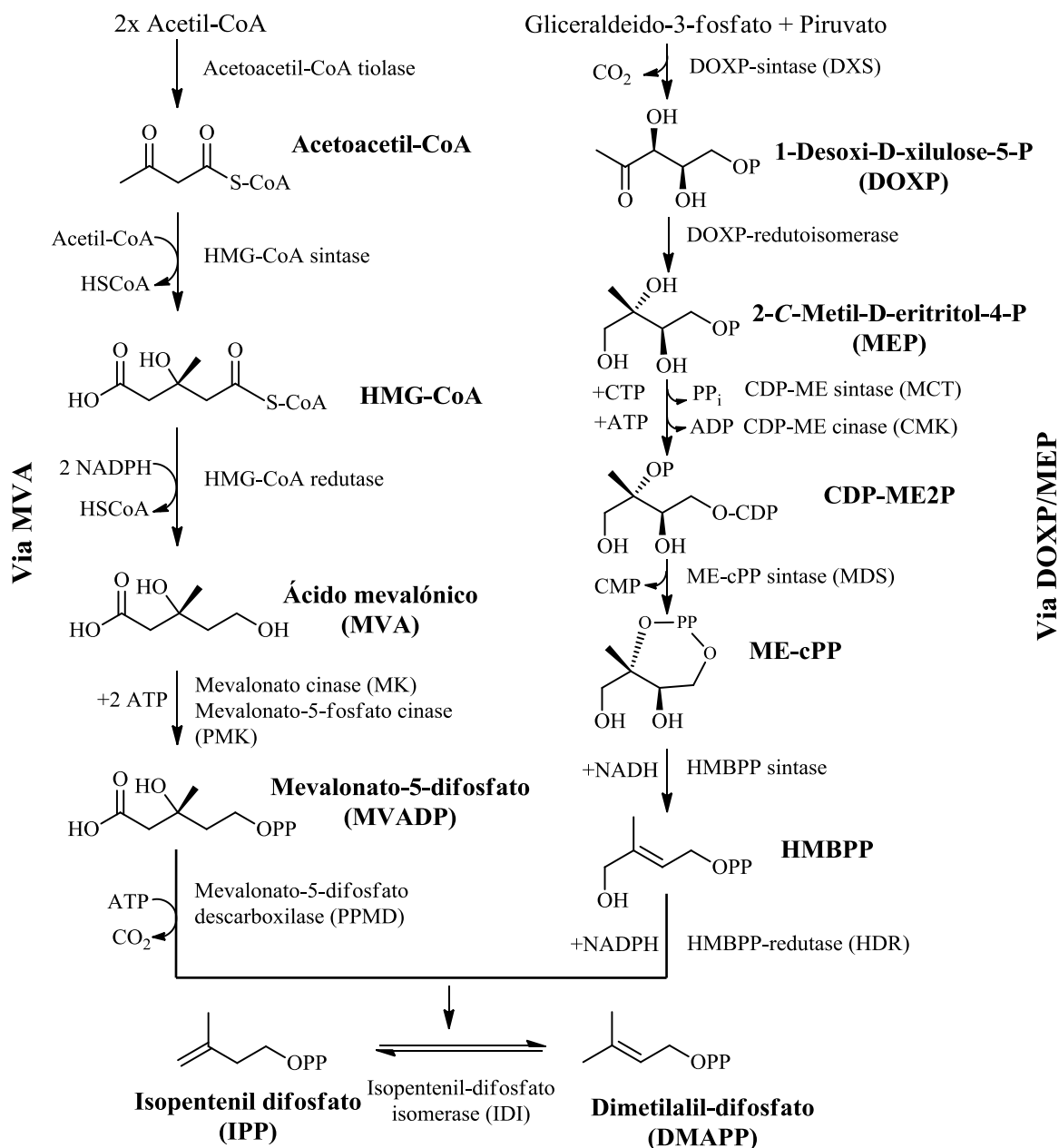


Figura 8 – Vias Mevalonato (MVA) e 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato/2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (DOXP/MEP). Abreviaturas da figura: **HMG-CoA**: 3-(S)-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, **CDPME2P**: 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato, **ME-cPP**: 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclo-difosfato, **HMBPP**: 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato (adaptado de: (31)).

Manzo *et al.* (49) identificou alguns diterpenos, designados como ditiodial, ditiol C e ditiol H, em algas castanhas do género *Dictyota* (Figura 9). De facto, estas espécies têm sido descritas como uma fonte rica destes metabolitos secundários. Os extratos ricos em diterpenos obtidos desta alga mostraram também conter atividades biológicas relevantes,

nomeadamente, propriedades anti-virais e anti-incrustação, e atividade citotóxica contra células cancerígenas (49).

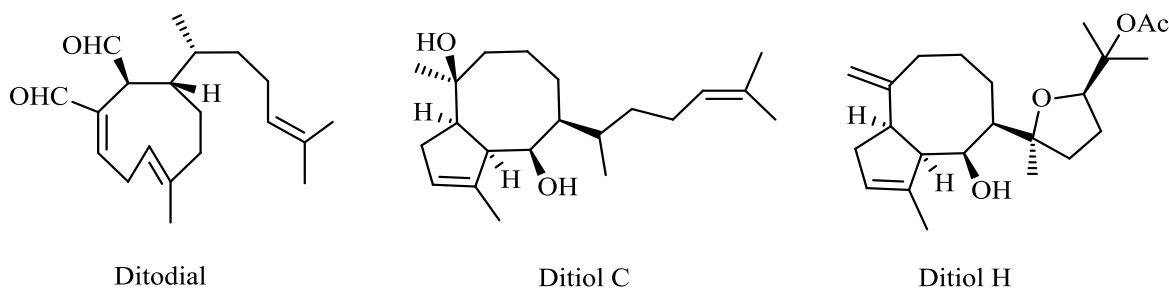


Figura 9 – Diterpenos identificados em algas castanhas do género *Dictyota*.

Os carotenóides, também conhecidos como pigmentos naturais da família dos terpenos, são bastante abundantes na natureza. Estruturalmente, apresentam um esqueleto de 40 átomos de carbono (tetraterpenos) que pode ter até 15 ligações duplas conjugadas. Uma ou ambas as ligações das extremidades podem sofrer ciclização formando um anel β -ionona que pode ter grupos substituintes oxo-, hidroxi-, ou epóxi- em diferentes posições, formando diferentes xantofilas (9,17). Estes compostos são constituintes essenciais do sistema fotossintético, principalmente no centro de reação dos fotossistemas. Os carotenóides podem atuar como pigmento acessório durante a fotossíntese, estabilizadores estruturais na montagem do sistema proteico dos fotossistemas, e ainda, como inibidores tanto da foto-oxidação ou como da oxidação por radicais livres provocada pelo excesso de exposição à luz. Estes metabolitos exercem importantes funções biológicas em bactérias, plantas, algas e animais. No caso dos animais, como estes não têm a capacidade de biosintetizar carotenóides, estes compostos têm de ser obtidos através da sua dieta (17). Diferentes carotenóides foram identificados em macroalgas (Figura 10), tais como o licopeno, α e β -caroteno, lutéina, violaxantina e fucoxantina (10), sendo o β -caroteno, a violaxantina e a fucoxantina os carotenóides mais abundantes nas algas castanhas (9,43). A fucoxantina apresenta diversos efeitos benéficos para a saúde, tais como, anti-obesidade, através do aumento de gasto energético do tecido adiposo branco da região abdominal e anti-diabetes melhorando a resistência à insulina e diminuindo o nível de glicose no sangue (40). Além destes pigmentos, as algas castanhas apresentam um outro pigmento, comum às plantas terrestres, a clorofila *a* (Figura 10), que na sua estrutura apresenta o diterpeno fitol (10).

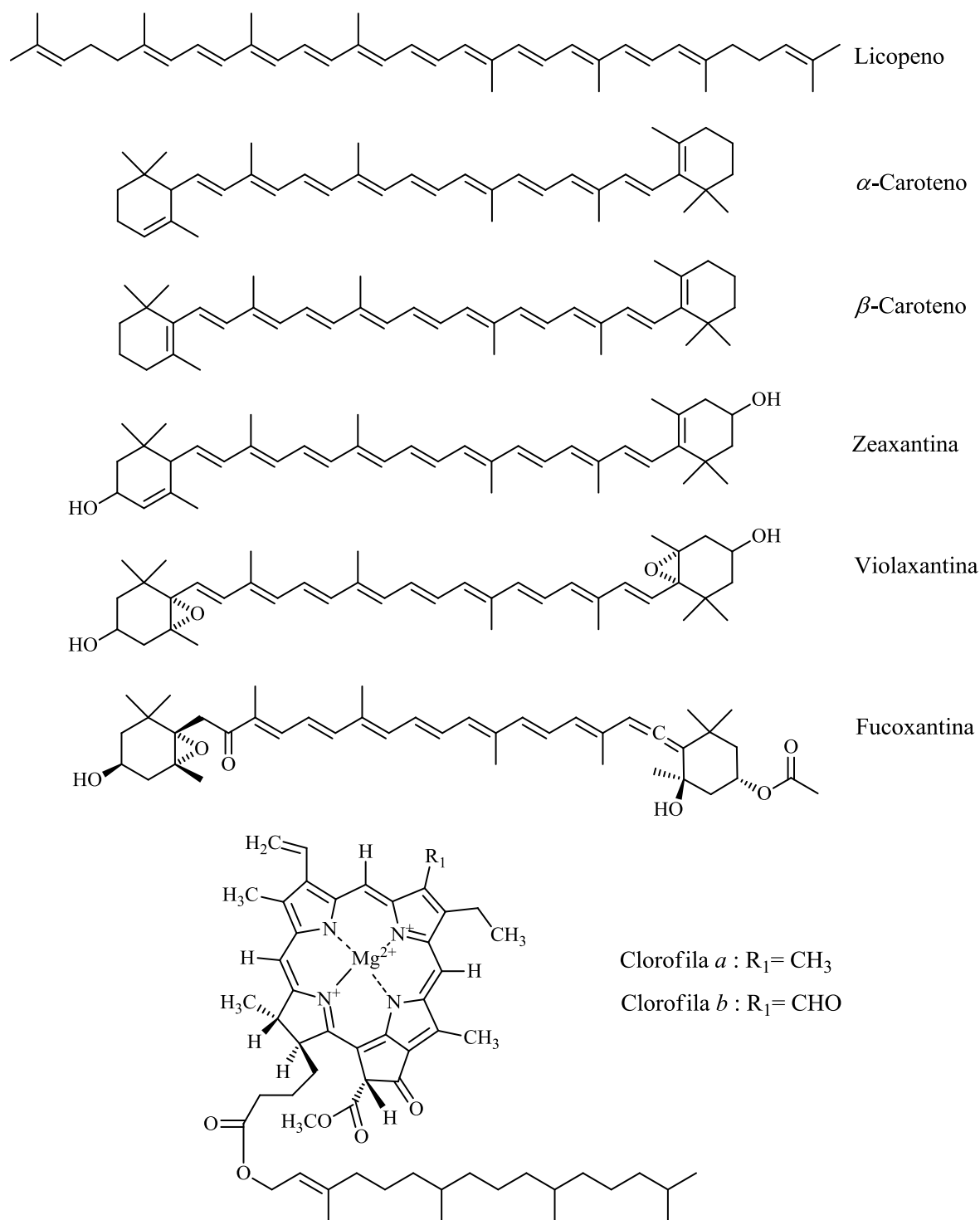


Figura 10 – Carotenóides e clorofilas existentes em macroalgas.

Os esteróis são componentes estruturais das membranas celulares que regulam a fluidez e a permeabilidade destas, sendo encontrados na maioria das células eucariotas.

Estes lípidos são também biossintetizados pela via do MVA e/ou via DOXP/MEP. O facto de serem sintetizados por duas vias diferentes, confere a estes compostos diferenças estruturais dependendo se advêm de plantas, animais ou fungos. O principal esterol das células animais é o colesterol e dos fungos é o ergosterol. As células vegetais normalmente apresentam uma mistura de fitoesteróis (esteróis vegetais) que são estruturas análogas ao colesterol (4,12,50). Estes compostos são constituídos por um sistema tetracíclico, apresentando um oxigénio (geralmente um grupo hidroxilo) na posição C3 e uma cadeia lateral de comprimento variável em C17, podendo apresentar ligações duplas e grupos metilo em diversas posições. Os fitoesteróis, contrariamente ao colesterol e esteróis C27, contêm um substituinte alquilo em C24. Este grupo substituinte não é derivado das vias biossintéticas de terpenóides, mas é adicionado pela enzima metil transferase esterol, numa etapa diferente da síntese de fitoesteróis. A atividade desta enzima é responsável pelo primeiro passo da produção de esteróis C28 e C29 (resultantes da adição de grupos metilo e etilo, respetivamente em C24) que controlam os níveis de colesterol em organismos fotossintéticos. A composição de esteróis em algas tem sido usada como biomarcadores quimiotaxonómicos para distinguir as três principais divisões de algas (Chlorophyta, Rhodophyta e Phaeophyceae) (31). Estes organismos apresentam diferentes perfis de fitoesteróis e de colesterol, sendo o conteúdo deste esterol significativamente maior em algas vermelhas (34-87 % do teor total de esteróis). As algas verdes e castanhas apresentam predominantemente esteróis C29 (71-95 %) (4). Os principais fitoesteróis identificados em algas estão representados na Figura 11 e são eles o desmosterol, colesterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol e o fucosterol, sendo este último o esterol predominante em algas castanhas (4). Estes compostos são nutricionalmente importantes, tendo-lhe sido atribuídas propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas e anti-tumurais (50). Uma dieta rica em esteróis vegetais tem ainda demonstrado uma redução dos níveis de colesterol no sangue (50).

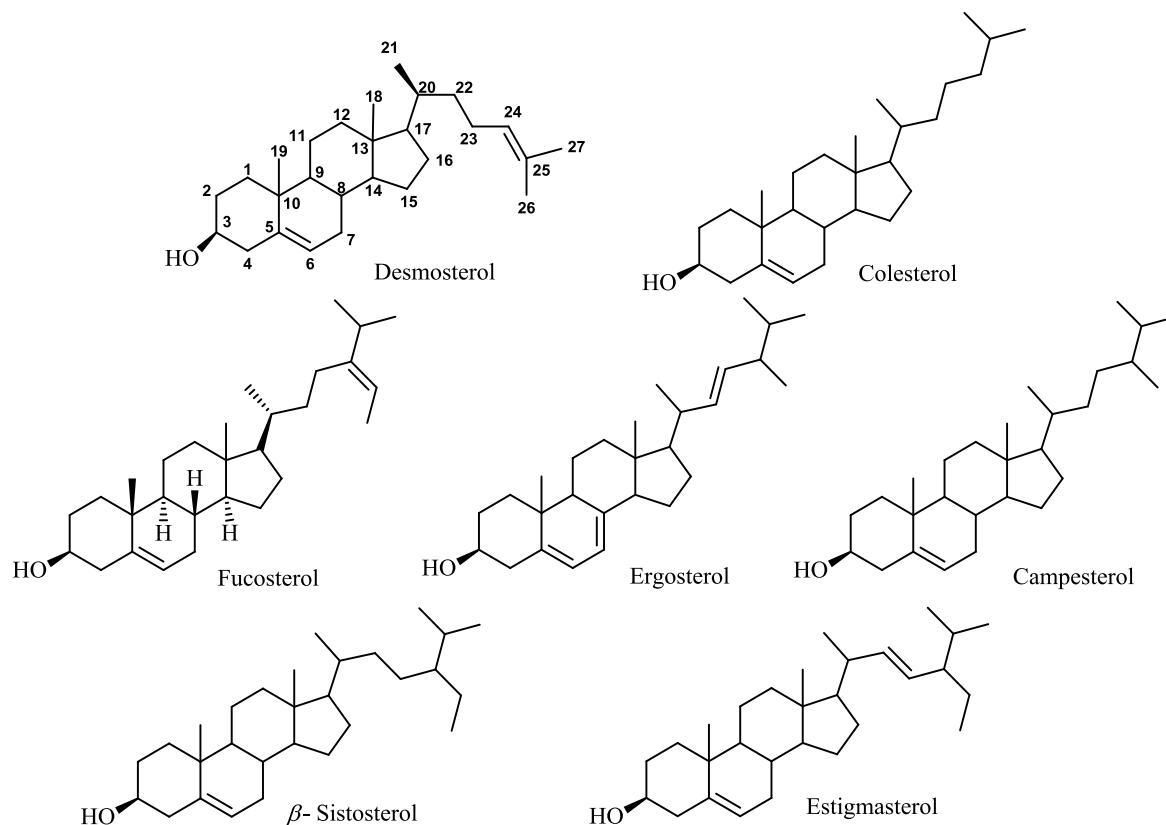


Figura 11 – Esteróis encontrados em macroalgas.

3.1.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma classe de metabolitos secundários que podem ser encontrados em plantas terrestres e em algas marinhas (51). A biossíntese destes compostos ocorre através da via xiquimato, que é sintetizado a partir dos substratos, fosfoenolpiruvato e eritrose 4-fosfato, que são derivados da glicólise e da via das pentose-fosfato, respetivamente. Da via xiquimato resulta a biossíntese de aminoácidos aromáticos, onde os aminoácidos tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) são precursores de fenilpropanóides (uma classe de compostos fenólicos) (Figura 12) (44,52,53).

Os compostos fenólicos têm como estrutura base um anel benzénico com um ou mais substituintes hidroxilo e variam entre fenóis simples a compostos poliméricos complexos. Estes compostos podem ser classificados em diferentes subclasses consoante o grupo funcional ligado ao anel aromático e em função do número de átomos de carbono na molécula, classificação adotada por Harborne e Simmonds (1964) (Tabela 2) (52).

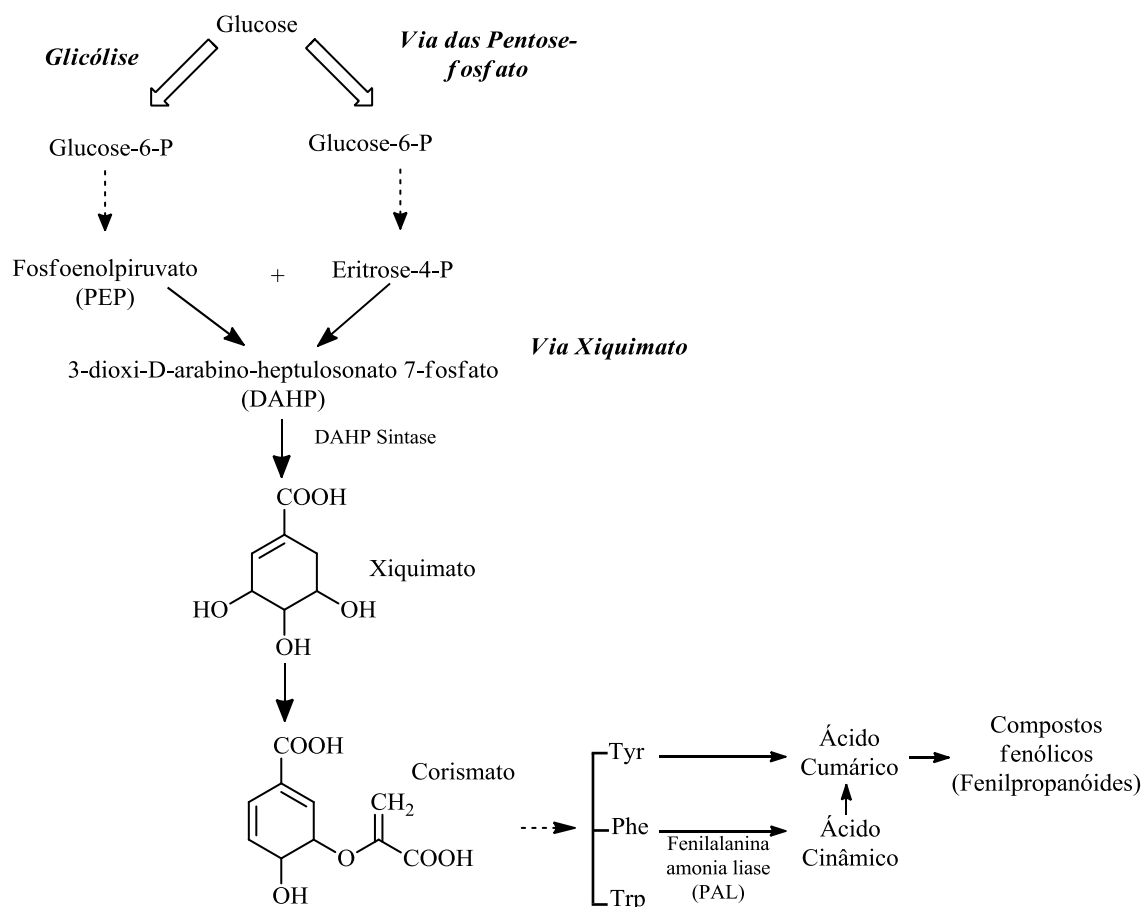


Figura 12 – Via xiquimato e síntese de compostos fenólicos pela via fenilpropanóide (Adaptado de: (29,53)).

Tabela 2 – Classificação de compostos fenólicos (adaptado a partir de (52)).

Estrutura	Classe
C ₆	Compostos fenólicos simples
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos e compostos relacionados
C ₆ -C ₂	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C ₆ -C ₃	Ácidos e aldeídos cinâmicos
C ₆ -C ₃	Cumarinas, isocumarinas e cromonas
C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzofenonas estilbenos, xantonas
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos, antraquinonas
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonóides e isoflavonóides e calconas
Lignanas	Dímeros ou oligómeros
Taninos	Oligómeros ou polímeros

Os ácidos e aldeídos fenólicos são caracterizados por terem, respectivamente, um grupo carboxílico ou um grupo aldeído como substituinte principal no anel aromático (52,54). Os

ácidos fenólicos são derivados do ácido hidroxibenzóico e incluem entre outros, o ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatequínico, ácido 2,3-di-hidroxibenzóico, ácido salicílico e o ácido gálico (32,34,55). Os ácidos cinâmicos contêm uma cadeia C₆-C₃ e incluem o ácido cinâmico, cafeico e o *p*-cumárico entre outros (34). Existem ainda os aldeídos fenólicos e alguns exemplos são o *p*-hidroxibenzaldeído e 3,4-di-hidroxibenzaldeído (34). Estes compostos, entre outros, foram já identificados em algas marinhas (Figura 13) (32,34,55).

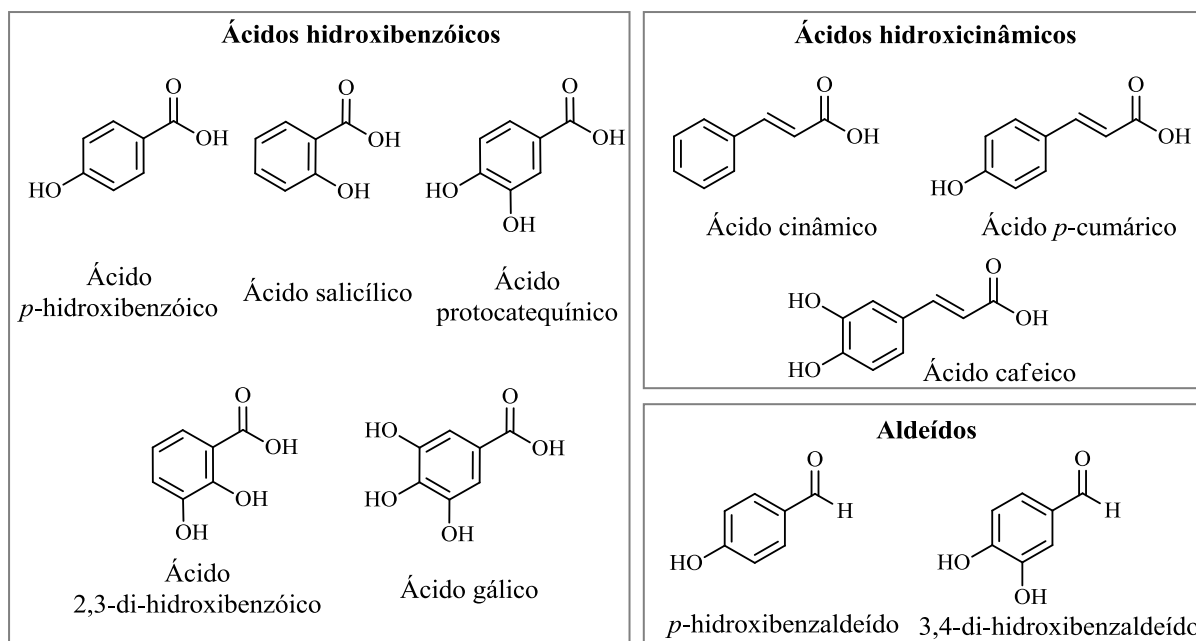


Figura 13 – Alguns exemplos de ácidos e aldeídos fenólicos presentes em algas.

Os flavonóides são a maior classe de compostos fenólicos, apresentando um esqueleto com 15 carbonos (C₆-C₃-C₆). Estes compostos apresentam uma estrutura comum composta por dois anéis aromáticos (anel A e B), ligados por uma cadeia de três átomos de carbono (C₃) (52,54). Esta classe de compostos pode ser dividida em diferentes subclasses em função da estrutura que a cadeia C₃ apresenta e do seu nível de oxidação. Se o grupo C₃ apresenta um heterociclo pirano (anel C) os flavonóides serão classificados como flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavan-3-óis e antocianidinas (Figura 14). Se a cadeia C₃ que liga os dois anéis aromáticos está aberta, então estamos perante um segundo grupo de flavonóides que inclui as calconas e as di-hidrocalconas (Figura 14) (56).

Em macroalgas, já foram identificados alguns flavonóides (flavanóis), nomeadamente a catequina e derivados de catequinas (ver estruturas no subcapítulo 3.2) (32,57,58).

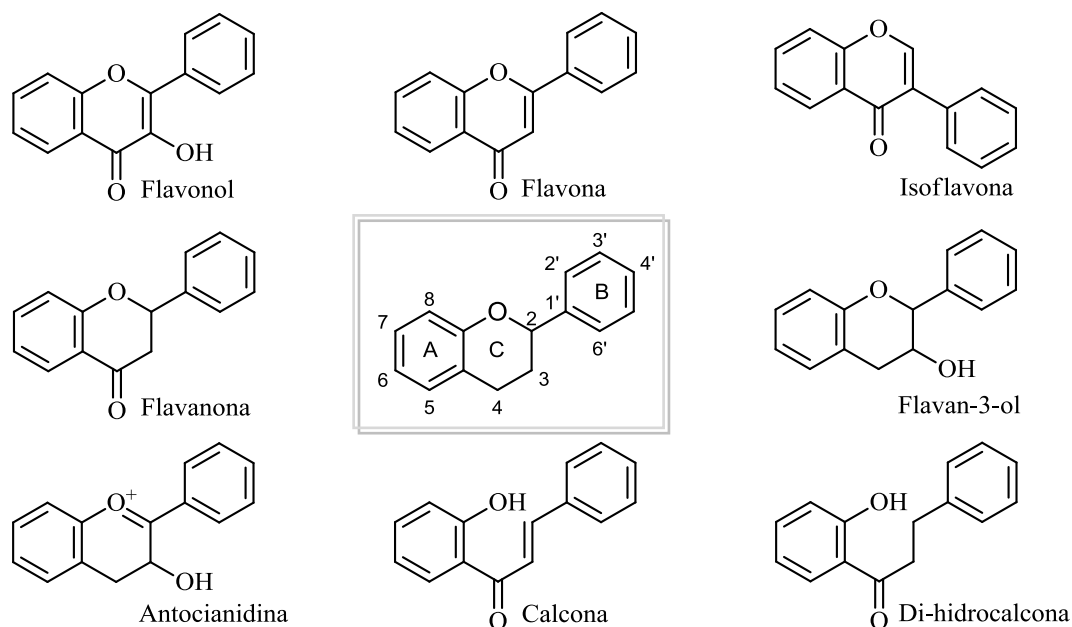


Figura 14 – Estrutura das diferentes subclasses flavonóides.

Os taninos são o terceiro grupo mais importante de compostos fenólicos com ocorrência natural, tanto em plantas terrestres como em plantas marinhas (44). Estes compostos apresentam uma grande diversidade estrutural, sendo classificados em taninos hidrolisáveis, taninos complexos e taninos condensados (Figura 15) (52).

Os taninos hidrolisáveis consistem em ésteres de ácido gálico e elágico. Os galotaninos contêm um núcleo poliol (normalmente glucose), substituído com um número variável de resíduos de ácido gálico. Os elagitaninos são derivados de pentagaloilglucose e, contrariamente aos galotaninos, apresentam ligações C-C adicionais entre os resíduos galoil adjacentes (44,52,56).

Os taninos complexos são compostos por uma molécula de catequina ligada a unidades de galotaninos ou elagitaninos por ligações glicosídicas (52,56), enquanto os condensados, também conhecidos por proantocianidinas, têm como precursores os flavonóides flavan-3-ol (catequina ou epicatequina) e flavano-3,4-diol (leucoantocianidina) (44,52,56).

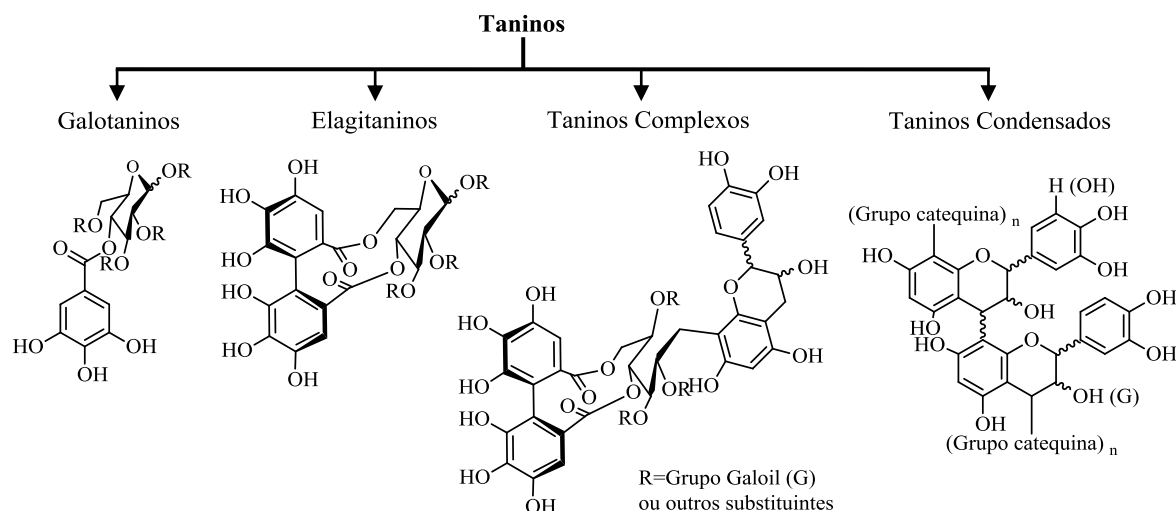


Figura 15 – Classificação de diferentes subclasses de taninos (adaptado de: (59)).

Nos últimos anos um grupo específico de taninos, os florotaninos, que são derivados de unidades polimerizadas de floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno), muito comum em algas marinhas, tem despertado o interesse da comunidade científica (51). A via biossintética pela qual o floroglucinol dá origem aos florotaninos ainda não é totalmente conhecida, em parte pela dificuldade em estabelecer metodologias para monitorizar a síntese de florotaninos a nível genético e enzimático (12,37). No entanto, o precursor dos florotaninos, o floroglucinol, é biossintetizado pela via acetato-malonato (Figura 16), também conhecida pela via do policétido, num complexo enzimático que envolve a atividade de duas enzimas, a policétido sintase e a policétido ciclase (12,37). Os precursores desta via são o malonil-CoA e o acetil-CoA, que formam um policétido que sofre uma reação de ciclização do tipo de Claisen formando um anel hexacíclico (tricétido), que não é estável e, portanto, sofre uma tautomerização para formar floroglucinol, que é termodinamicamente mais estável (12).

Os florotaninos são compostos hidrofílicos, com pesos moleculares entre 126 Da a 650 kDa (60) e são isolados a partir de algas marinhas, principalmente das algas castanhas, não se encontrando em plantas terrestres (43,51). Estes compostos podem ser oligómeros ou polímeros de floroglucinol, podendo ser classificados em 6 sub-classes, com base na ligação entre floroglucinois: fucois (ligações arilo-arilo); floretois, hidroxifloretois e fualois (ligações éter); fucofloretois (ligações arilo-arilo e éter) e ecois (ligação dibenzodioxina) (12,37).

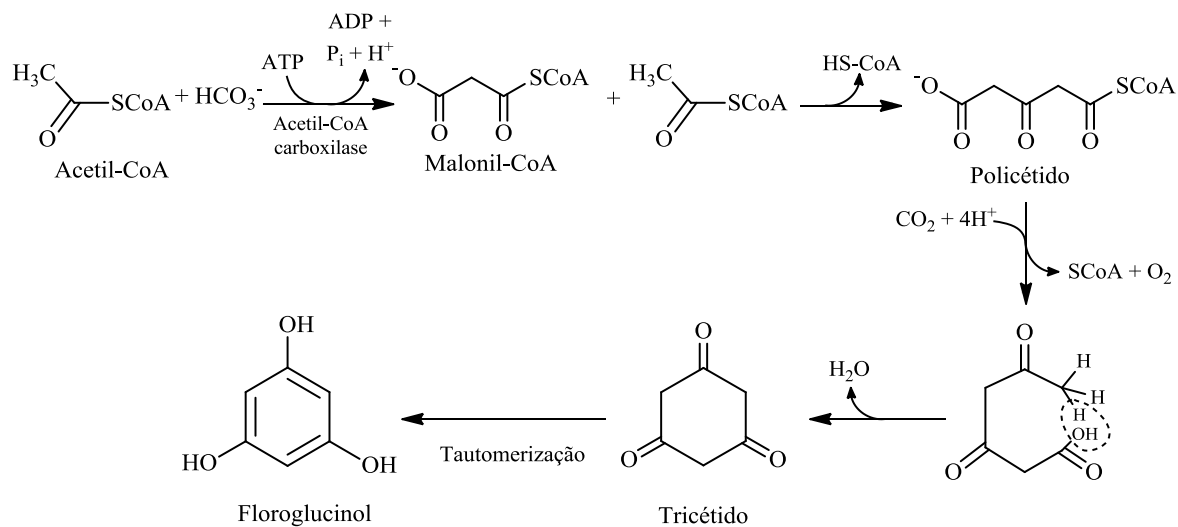


Figura 16 – Biossíntese do floroglucinol pela via etilo-malonato (adaptado de: (12)).

Alguns estudos têm verificado que as algas castanhas são mais ricas em florotaninos do que as outras algas (51). Na Figura 17 estão representados alguns florotaninos identificados em algas castanhas, nomeadamente, na *Ecklonia cava*, *Ecklonia stolonifera*, *Eisenia arborea*, *Eisenia bicyclis*, *Ishige okamurae* e *Ecklonia kurome*. Estes compostos têm sido associados a várias atividades biológicas benéficas para a saúde (60).

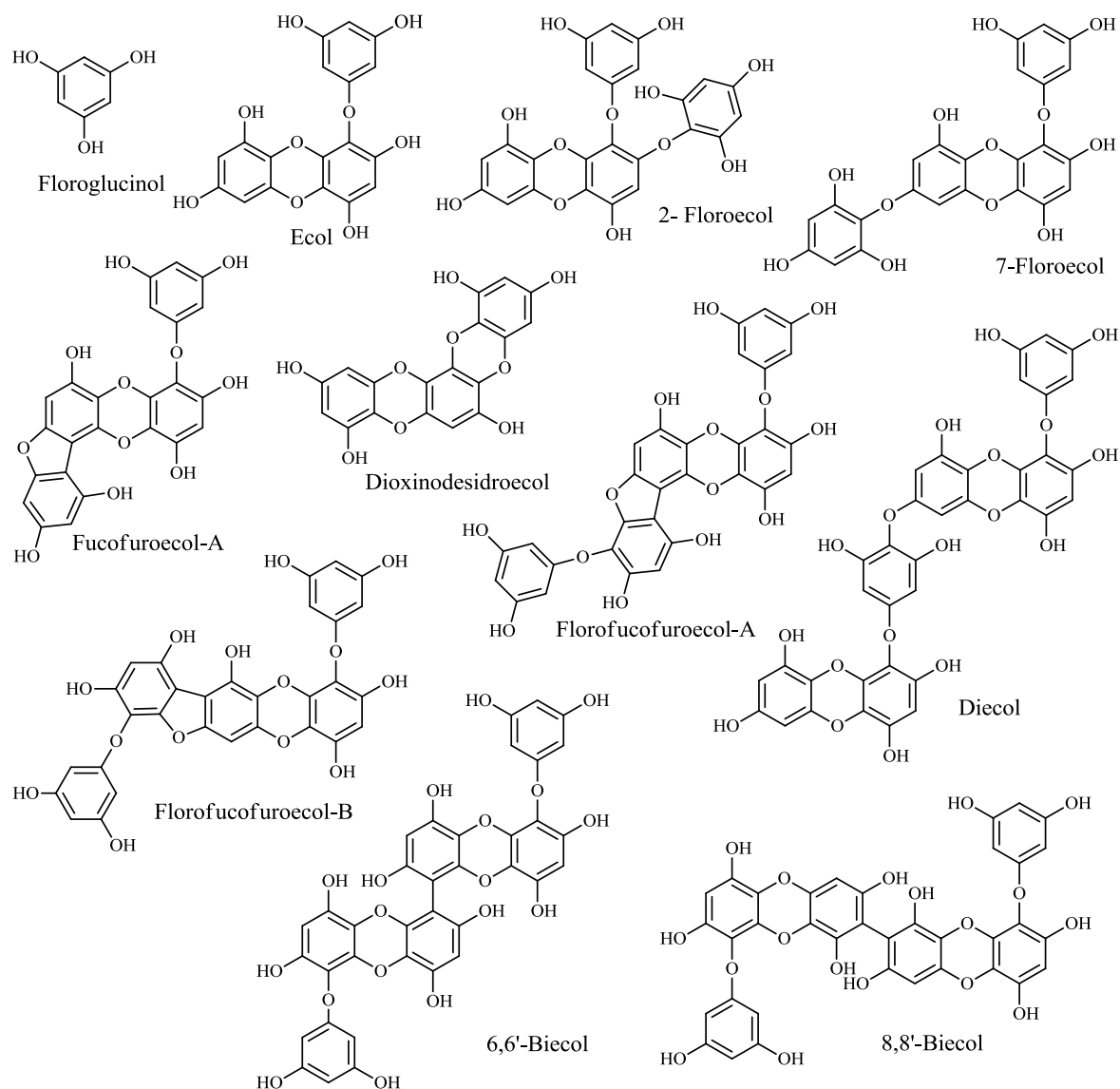


Figura 17 – Florotaninos derivados de macroalgas castanhas.

3.2. Composição química das macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*

Neste estudo foram selecionadas três macroalgas castanhas, cujo consumo como alimento é bastante elevado, nomeadamente a *Himanthalia elongata*, a *Laminaria ochroleuca* e a *Undaria pinnatifida* (Figura 18). A caracterização da composição química das macroalgas tem incidido sobretudo nas macroalgas castanhas. Devido às suas grandes dimensões, estes organismos apresentam vantagens em relação às outras algas pois, em

termos de biomassa, a sua exploração é mais vantajosa e a sua recolha nas zonas costeiras é mais fácil (15,33).



Figura 18 – Ilustração das macroalgas castanhas em estudo: A- *Himanthalia elongata*, B- *Laminaria ochroleuca* e C - *Undaria pinnatifida* (61).

A *Himanthalia elongata* é uma macroalga castanha (Figura 18-A), cuja cor varia entre castanho a castanho esverdeado. Reconhecida como “spaghetti do mar”, apresenta ramificações na forma de “tiras” com 2 ou 3 metros de comprimento e 1 centímetro de largura. Esta alga castanha tem uma vida útil de 2 a 5 anos e encontra-se normalmente na costa, alojada nas rochas, nos limites de maré baixa, sendo considerada uma espécie infralitoral que sofre exposição moderada de luz (61). Geograficamente pode ser encontrada entre o sul do Oceano Ártico e o nordeste do Oceano Atlântico, no mar Báltico e no mar Norte. Na Península Ibérica localizam-se numa área delimitada entre o norte de Portugal e o norte de Espanha (61). Para além do seu consumo como alimento, tanto no seu estado fresco como seco, pode ainda ser utilizada como fertilizante ou em produtos de cuidados pessoais (champôs, tratamentos para o cabelo, produtos de limpeza facial e de cuidados da pele) (61). Da sua composição química fazem parte aminoácidos essenciais, vitaminas (A, C e E) e outros minerais naturais (61), destacando-se principalmente pelo seu elevado teor de ferro e vitamina C, que facilita a absorção deste mineral (10).

A alga *Laminaria ochroleuca* (Figura 18-B), denominada por “Kombu atlântico”, é uma alga amarela-acastanhada com comprimento máximo de 2 m, encontrando-se predominantemente em zonas de águas baixas. Trata-se de uma alga perene, que mantém a sua estipe ao longo do ano, regenerando a lâmina, apenas a cada ano. A *L. ochroleuca* encontra-se em zonas interdiais, zonas mais expostas à luz, podendo ocorrer até 30 metros

de profundidade. Esta alga encontra-se distribuída ao longo da costa da Península Ibérica desde Santander (Cantábria) até ao cabo Mondego (Portugal). A *L. ochroleuca* é conhecida por reduzir a inflamação quando aplicada topicamente (61). Os seus extratos têm aplicação na indústria de cosmética, protegendo o DNA dos raios UV e prevenindo o envelhecimento precoce da pele (5).

A *Undaria pinnatifida* (Figura 18-C), também conhecida por “Wakame”, é uma espécie anual, com cor castanha-esverdeada e atinge comprimentos entre 1 a 3 metros. Esta alga tem origem no Pacífico, tendo sido detetada pela primeira vez na Galiza em 1988. A *U. pinnatifida* está indicada como uma das espécies mais invasoras do mundo. Em Portugal foi identificada entre 1999 a 2007 em apenas dois locais no Norte de Portugal (Douro Litoral - Póvoa de Varzim e Beira Litoral - Praia da Barra em Aveiro), o que indica que se trata de uma colonização recente (61,62). Esta espécie é a segunda mais consumida no mundo e pode ser encontrada na parte superior do infralitoral com profundidades entre 10 a 18 metros, podendo crescer em profundidades maiores caso a água seja clara e limpa. A *U. pinnatifida* é rica em hidratos de carbono, lípidos, minerais, aminoácidos essenciais e vitaminas (61). Esta alga é ainda uma fonte rica em fucoxantina, um pigmento que tem sido referenciado por conter propriedades dietéticas. Alguns estudos têm descrito que o consumo desta alga tem benefícios para a saúde, como por exemplo, na regulação menstrual, na purificação do sangue e benefícios para o cabelo e para a pele (61). Na indústria esta alga é usada na área da cosmética, como por exemplo, em champôs, produtos para limpeza de pele, cremes faciais, sabonetes, pomadas, óleos corporais, etc. A *U. pinnatifida* é ainda utilizada como fertilizante e tratamentos agrícolas (61).

Sánchez-Machado *et al* (33) estudaram o conteúdo de ácidos gordos, lípidos totais e proteínas das espécies *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida* recolhidas no noroeste da costa ibérica. Este estudo demonstrou que estas macroalgas apresentam diferentes teores de proteínas, variando entre 5.46 ± 0.16 g/100g de peso seco para a alga *H. elongata*, 7.49 ± 0.12 g/100g de peso para a *L. ochroleuca* e 18.0 ± 1.46 g/100g de peso seco para a *U. pinnatifida*. O conteúdo de lípidos totais para as três algas foi baixo, no entanto todas as algas apresentaram ácidos gordos essenciais como o ácido octadeca-9,12-dienóico (ω -6) e o ácido octadeca-9,12,15-trienóico (ω -3). A *H. elongata* foi a que apresentou maior teor de ácidos gordos saturados e MUFAs, enquanto que a *U. pinnatifida* foi a alga castanha que apresentou teores mais elevados de PUFA ω -6 e ω -3. A *H. elongata* foi a macroalga que

mostrou ter teores relativos de PUFA's mais baixos (33). O ácido hexadecanóico foi identificado como o ácido gordo mais abundante na *H. elongata* e na *L. ochroleuca*, enquanto a fração de ácidos gordos da *U. pinnatifida* mostrou ser maioritariamente constituída pelo ácido octadeca-6,9,12,15-tetraenóico (Tabela 3) (33). Apesar de, do ponto de vista qualitativo, já existir alguma informação acerca da composição da fração lipofílica destas algas, do ponto de vista quantitativo a informação ainda é escassa. De facto, os estudos que existem apenas descrevem teores relativos desses compostos (em %).

Tabela 3 – Teor relativo de ácidos gordos (%)^a nas macroalgas secas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida* (33).

<i>Ácidos Gordos^b</i>		<i>Himanthalia elongata</i>	<i>Laminaria ochroleuca</i>	<i>Undaria pinnatifida</i>
C14:0	Ácido tetradecanóico	5.85±0.35	4.97±0.20	3.17±0.31
C16:0	Ácido hexadecanóico	32.53±1.61	28.51±1.87	16.51±1.35
C16:1 ω-7	Ácido hexadeca-9-enóico	2.79±0.25	5.62±0.71	3.70±0.88
C16:2 ω-4	Ácido hexadeca-9,12-dienóico	tr	---	tr
C16:3 ω-4	Ácido hexadeca-6,9,12-trienóico	4.38±1.33	0.87±0.10	2.31±1.94
C18:0	Ácido octadecanóico	0.68±0.15	0.34±0.14	0.69±0.08
C18:1 ω-9	Ácido octadeca-9-enóico	19.96±2.01	13.62±1.24	6.79±0.90
C18:2 ω-6	Ácido octadeca-9,12-dienóico	4.39±0.34	6.79±0.61	6.23±0.32
C18:3 ω-3	Ácido octadeca-9,12,15-trienóico	8.79±0.71	5.15±0.71	11.97±1.75
C18:4 ω-3	Ácido octadeca-6,9,12,15-tetraenóico	3.53±0.56	10.77±1.85	22.60±2.48
C20:4 ω-6	Ácido eicosa-5,8,11,14-tetraenóico	10.69±1.30	14.20±0.66	15.87±1.68
C20:4 ω-3	Ácido eicosa-8,11,14,17-tetraenóico	0.88±1.80	0.54±0.90	0.70±0.14
C20:5 ω-3	Ácido eicosa- 5,8,11,14,17-pentaenóico	5.50±1.78	8.62±0.56	9.43±0.69
	Ácidos gordos saturados	39.06±2.11	33.82±2.21	20.39±1.73
	Mono-insaturados	22.75±2.26	19.23±1.99	10.50±1.78
	PUFA's	38.16±7.84	46.94±4.58	69.11±9.01
	PUFA's ω6	15.08±1.64	20.99±1.27	22.10±2.00
	PUFA's ω3	18.70±4.84	25.08±3.21	44.70±5.05
	Rácio ω6/ω3	0.81	0.83	0.49

^a Média ± desvio padrão (n=10).

tr (trace)= vestígios

O conteúdo relativo de esteróis encontrados por Sánchez-Machado *et al.* (50) para as algas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida* encontra-se na Tabela 4. Nestas algas foram identificados os esteróis fucosterol, 24-etilenocolesterol, colesterol, campesterol e estigmasterol, sendo o fucosterol o esterol predominante nas três espécies, enquanto que o colesterol, campesterol e estigmasterol apenas foram encontrados em quantidades vestigiais (50).

Tabela 4 – Teor relativo de esteróis (%) nas macroalgas secas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida* (50).

<i>Esterol (%)</i>	<i>H. elongata</i>	<i>L. ochroleuca</i>	<i>U. pinnatifida</i>
Fucosterol	97.3 ± 0.6	85.9 ± 1.4	82.9 ± 1.8
24-Etilenocolesterol	2.6 ± 0.6	14.1 ± 1.3	16.8 ± 1.8
Colesterol	---	tr	tr
Campesterol + Estigmasterol	tr	tr	tr

tr (trace)= vestígios

Rodríguez-Bernaldo *et al.* (32) detetaram diferentes compostos fenólicos, em particular flavanóis, em diferentes espécies de algas castanhas e vermelhas, incluindo nas espécies *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*, recolhidas na costa da Galiza. Os flavanóis identificados foram a catequina (C), a epicatequina (EC), a epigallocatequina (EGC), a catequina galato (CG), a epicatequina galato (ECG) e a epigallocatequina galato (EGCg) (Figura 19) (32).

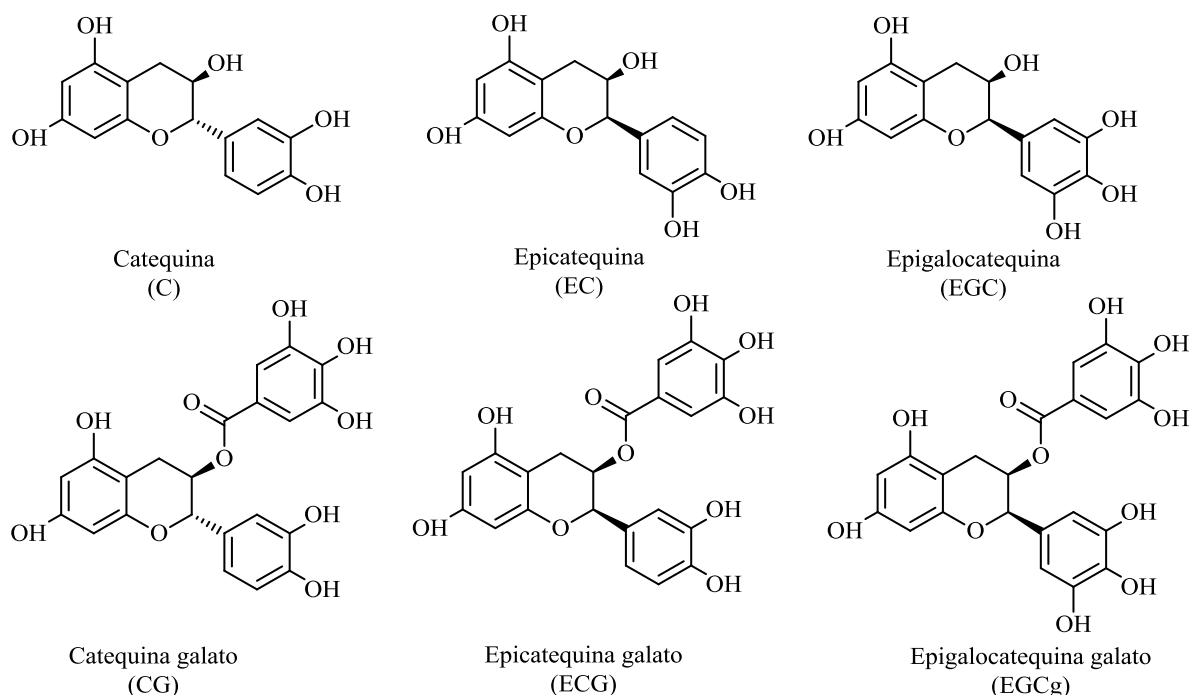


Figura 19 – Exemplos de flavanóis presentes em macroalgas.

Segundo este mesmo autor a concentração de compostos fenólicos varia consoante o habitat, as condições ambientais e a época de colheita. Das três algas castanhas em estudo, a *L. ochroleuca* é a que tem sido descrita por conter uma maior quantidade de flavonóides (flavan-3-ol), apresentando diferentes compostos, tais como, a EGC, a EC, a ECGg e a CG, no entanto não apresentou ácido gálico (32). Nas macroalgas *H. elongata* e a *U. pinnatifida* foi ainda identificada a presença de ácido gálico, sendo este o único composto fenólico identificado na *U. pinnatifida*. A EGC foi descrita como o composto fenólico maioritário das espécies *H. elongata* e *L. ochroleuca*, com uma concentração de $715.6 \pm 8.3 \mu\text{g/g}$ e $760.2 \pm 5.2 \mu\text{g/g}$ de peso seco, respetivamente (Tabela 5) (32).

Tabela 5 – Composição de compostos fenólicos nas macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida* ($\mu\text{g/g}$ de peso seco) (32).

<i>Espécies</i>	<i>Ácido gálico</i>	<i>EGC</i>	<i>EC</i>	<i>ECGg</i>	<i>ECG</i>	<i>CG</i>
<i>H. elongata</i>	55.6 ± 9.1	715.6 ± 8.3	---	---	---	---
<i>L. ochroleuca</i>	---	760.2 ± 5.2	28.7 ± 2.0	9.7 ± 1.3	11.2 ± 1.6	21.4 ± 5.7
<i>U. pinnatifida</i>	191.7 ± 5.2	---	---	---	---	---

Estas macroalgas foram também descritas por conterem valores elevados de vitaminas (A, B1, B2, C e ácido fólico). Alguns minerais (Na, K, P, Ca, Mg, Fe e I) foram também identificados nas algas *H. elongata* e *U. pinnatifida* (13).

Apesar de ser conhecida a variabilidade da composição química das algas consoante o habitat, a estação, etc., até ao momento, nenhum estudo foi publicado sobre a caracterização química das algas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*, provenientes da costa portuguesa.

3.3. Efeitos benéficos para a saúde

Têm sido inúmeras as atividades biológicas atribuídas aos metabolitos secundários de origem marinha, e em particular, aos provenientes das macroalgas castanhas (21). Estas atividades incluem, atividades anti-inflamatórias, anti-bacterianas, antioxidantes, anti-virais, anti-hipertensivas, anti-obesidade, anti-diabetes, antifúngicas, anti-tumurais anti-fotoenvelhecimento, entre outras (21,40,50,60). A Tabela 6 identifica compostos isolados de macroalgas com potenciais benefícios para a saúde.

Tabela 6 – Compostos biologicamente ativos isolados a partir de macroalgas.

<i>Classes de composto</i>	<i>Composto</i>	<i>Macroalga</i>	<i>Potencial benefício para a saúde</i>	<i>Ref.</i>
Lípidos e ácidos gordos	Ácido estearidónico e ácido γ -linolénico	<i>Enteromorpha linza</i>	Atividade antimicrobiana	(63)
	PUFAS ω -3 e ω -6		Redução do risco de doenças cardiovasculares	(40)
Carotenóides	Fucoxantina		Anti-obesidade e anti-diabetes	(40)
	Fucoxantina	<i>Undaria pinnatifida</i>	Anti-tumoral	(64)
	Zeaxantina	<i>Ascophyllum</i>	Diminuição do risco de doenças	(65)
	Luteína	<i>nodosum</i>	oftalmológicas	
Esteróis	β -sitosterol		Redução do colesterol	(9)
	Fucosterol			
	Fucosterol	<i>Pelvetia siliquosa</i>	Anti-diabetes	(66)
Vitaminas	α -tocoferol		Antioxidante	(9)

Polissacarídeos	Galatofucanos (fucoidanos)	<i>Adenocystis utricularis</i>	Inibição da infecção do HSV 1 e 2 (antiviral)	(67)
	Fucoidanos	<i>Ecklonia cava</i> , <i>Sargassum hornery</i> , <i>Costaria costalla e</i> <i>Undaria pinnatifida</i>	Anti-tumoral	(9,68,69)
	Laminarina	<i>Laminaria japonica</i>	Anti- apoptótica	(70)
Diterpenos	8,10,18-tri-hidroxi-2,6-dolabeladieno	<i>Dictyota pfaffii</i>	Inibição da infecção de HSV-1; diminuição do teor de proteínas precoces de HSV-1	(71)
	(6R)-6-hidroxicotoma-4,14-dieno-1,17-dial	<i>Dictyota menstrualis</i>		

Os florotaninos têm também evidenciado várias potencialidades farmacológicas, identificadas na Tabela 7 (43,60). Estes potenciais benefícios para a saúde têm sido estudados de forma a puderem ser aproveitados nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar (60).

Tabela 7 – Resumo de florotaninos encontrados em algas castanhas e as suas possíveis aplicações farmacológicas (adaptado de: (60)).

<i>Florotaninos</i>	<i>Algas marinhas</i>	<i>Aplicação Farmacológica</i>
Diecol	<i>Eisenia bicyclis</i> e <i>Ecklonia cava</i>	Anti-diabético
Ecol	<i>Eisenia bicyclis</i>	
Florofucofuroecol-A	<i>Ecklonia stolonifera</i>	
Difloreto-hidroxycarmalol	<i>Ishige okamurae</i>	
Dioxinodesidroecol	<i>Ecklonia cava</i>	Anti-cancerígeno
Ecol	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Anti-hipertensão
Florofucofuroecol		
Diecol		
Diecol	<i>Ecklonia cava</i> e <i>Ecklonia stolonifera</i>	Anti-fotoenvelhecimento
Ecol		
Diecol	<i>Ecklonia cava</i>	Inibição MMP
Ecol e Fucofuroecol-A	<i>Eisenia bicyclis</i>	

8,8'-Biecol Florofucofuroecol-A Ecol Diecol	<i>Eisenia bicyclis</i> , <i>Ecklonia cava</i> e <i>Ecklonia kurome</i>	Antioxidante
6,6'-Biecol 8,8'-Biecol 8,8'-Diecol	<i>Ecklonia cava</i>	Anti-HIV
6,6'-Biecol Florofucofuroecol B Ecol e diecol	<i>Ecklonia cava</i> <i>Eisenia arborea</i> <i>Ecklonia stolonifera</i>	Anti-alérgico

A atividade antioxidante, em particular, tem sido intensamente estudada devido ao interesse da indústria farmacêutica em encontrar antioxidantes eficazes e não tóxicos, provenientes de fontes naturais, que inibam o *stress* oxidativo, resultando numa diminuição do risco de doenças inflamatórias, doenças cardiovasculares, cancro, diabetes, cataratas e doenças neurodegenerativas (72,73).

3.3.1. Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante de extratos brutos e purificados e/ou compostos isolados tem sido incluída na maioria dos estudos que envolvem a análise de extratos naturais e os seus efeitos benéficos (43).

O *stress* oxidativo é definido como uma condição biológica onde ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua desintoxicação, através de sistemas biológicos enzimáticos e não enzimáticos (74). Um aumento significativo da formação de espécies reativas e/ou diminuição da atividade fisiológica das defesas antioxidantes causam perturbações no estado redox da célula que pode causar efeitos tóxicos, podendo levar à morte celular no caso de elevados níveis de *stress* oxidativo (75). O excesso de espécies reativas pode danificar lípidos, proteínas e DNA, inibindo a sua função normal e, consequentemente, contribuir para a patogénese e fisiopatologia de muitas doenças humanas, tais como, doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica), doenças cardiovasculares e

inflamatórias, cancro, diabetes e isquemia/reperfusão, contribuindo também no processo de envelhecimento (74,76).

3.3.1.1 Espécies reativas

As espécies reativas mais comuns são as espécies reativas de oxigénio (ROS) e as espécies reativas de azoto (RNS do inglês, *Reactive Nitrogen Species*) (77).

As espécies reativas de oxigénio são o produto do metabolismo celular aeróbico por redução da molécula de oxigénio (78). A sua formação pode ocorrer extracelularmente, intracelularmente, ou em compartimentos celulares específicos, nomeadamente na mitocôndria, uma das principais fontes de ROS endógenos que resultam, maioritariamente, da cadeia transportadora de eletrões (76,79). Estas espécies reativas são representadas por radicais livres, tais como, anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxilo (OH^{\bullet}), peróxido (ROO^{\bullet}) e alcóxido (RO^{\bullet}), e não-radicais, como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o oxigénio singlete (1O_2) e ácido hipocloroso ($HOCl$) (74,76–78). Algumas das enzimas responsáveis pela formação de ROS são a NAD(P)H-oxidase (NOX), a xantina oxidase, a ciclo-oxigenase (COX), a lipo-oxigenase, a heme-oxigenase, a óxido nítrico sintase (NOS), a mieloperoxidase e a citocromo P450 mono-oxigenase (79). Elevados níveis intracelulares de cobre e ferro também podem levar à formação de espécies reativas (77). O H_2O_2 pode ainda ser convertido em oxidantes clorados, na presença do anião cloreto (Cl^-), reação catalisada pela enzima mieloperoxidase (MPO) (74). A Figura 20 ilustra a formação de alguns ROS, onde oxidases convertem o oxigénio a $O_2^{\bullet-}$ que é dismutado em H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 pode então ser convertido em H_2O pela glutathione peroxidase (GPx) ou pela catalase (CAT) ou então reduzido a OH^{\bullet} (via reação de Fenton), que pode desencadear peroxidação lipídica libertando produtos lipídicos reativos (74,77,79).

As RNS, tal como as ROS, também são produtos do metabolismo celular e formam-se quando o óxido nítrico (NO^{\bullet}) reage com o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), formando o peroxinitrito ($ONOO^-$) (80). O peroxinitrito trata-se de um oxidante bastante forte que no estado protonado sofre cisão homolítica produzindo o radical hidroxilo (OH^{\bullet}) e dióxido de azoto (NO^{\bullet}) (80). A biossíntese do NO^{\bullet} ocorre a partir da oxidação da L-arginina a L-citrulina, num processo catalisado por enzimas óxido nítrico sintase (NOS) que apresenta

três isoformas, neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS) (Figura 20) (76,80).

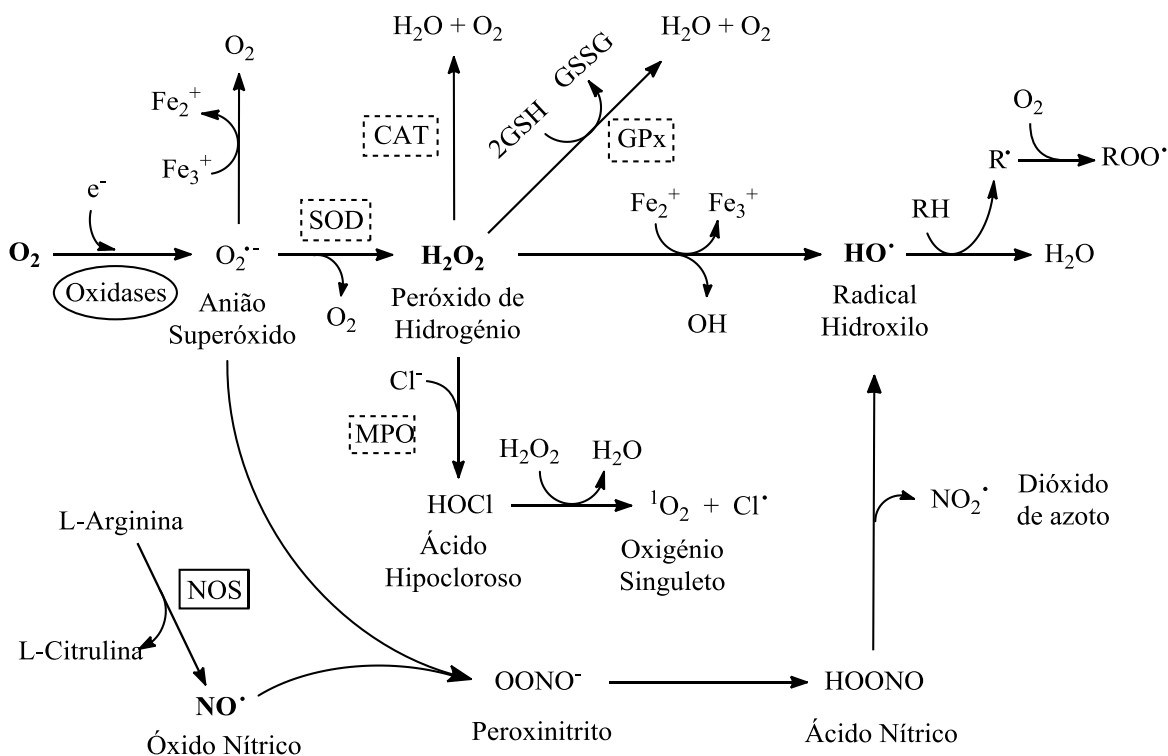


Figura 20 – Formação de ROS/RNS a partir dos radicais livres superóxido e óxido nítrico e um conjunto de reações subsequentes onde se formam metabolitos ainda mais reativos (Adaptado de: (76,79,81)).

Em condições fisiológicas normais, o equilíbrio entre as substâncias pró-oxidantes (ROS/RNS) e antioxidantes é deslocado ligeiramente a favor de produtos pró-oxidantes, favorecendo o *stress* oxidativo leve (75). Na realidade, ROS/RNS apresentam um duplo papel, apresentando efeitos nocivos e/ou benéficos nas células (76). Para além dos efeitos nocivos referidos anteriormente, estes oxidantes, em concentrações abaixo dos limites tóxicos, têm um papel importante na regulação de alguns processos fisiológicos das células, tal como, na defesa contra patogénicos, nas vias de sinalização celular e a nível da expressão génica (76). De facto, a supressão completa destas espécies reativas não é benéfica e as ROS são necessários para o funcionamento de alguns processos metabólicos (81). Para controlar a produção de ROS, os organismos desenvolveram um sistema de proteção organizado que inclui: (i) mecanismos de prevenção, (ii) mecanismos de reparação e (iii) defesas antioxidantes (76).

Os antioxidantes biológicos são definidos como compostos que, quando presentes em concentrações mais baixas, comparativamente a um substrato oxidante, é capaz de atrasar ou evitar a oxidação do substrato (74).

A homeostasia celular redox é mantida através de um complexo sistema de defesa antioxidante. Estas defesas podem ser exógenas ou endógenas, sendo a fruta, legumes, e cereais as principais fontes de antioxidantes exógenos (74,75). As defesas antioxidantes endógenas incluem enzimas antioxidantes, tais como, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatioma peroxidase (GPx), enquanto que os antioxidantes não enzimáticos são representados por vitaminas como o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E), glutatioma (GSH), carotenóides, flavonóides, proteínas (ferritina, transferrina, ceruloplasmina e a albumina) e ainda, proteínas sequestradoras de baixo peso molecular (ácido úrico, coenzima Q e ácido lipóico) (74–76).

3.3.1.2 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante de extratos naturais e/ou compostos isolados pode ser facilmente avaliada por métodos espectrofotométricos. Contudo, estes ensaios não refletem as condições fisiológicas, apenas contribuem para uma primeira abordagem do potencial biológico dos extratos e dos seus compostos (72).

Numerosos ensaios *in vitro* têm sido usados para medir a atividade antioxidante, tais como, ORAC (do inglês, *oxygen radical absorbance capacity*), TRAP (do inglês, *total radical-trapping antioxidant parameter*), FRAP (do inglês, *ferric reducing antioxidant power*) TEAC/ABTS (do inglês, *trolox equivalents antioxidant capacity / 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid)*), DPPH (do inglês, *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), etc. Destes, o método DPPH tem sido o mais utilizado em estudos de todo o mundo (82).

O ensaio DPPH consiste na redução do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) pela amostra em estudo. Este método é simples e bastante sensível, baseado na teoria de que um dador de hidrogénio é um antioxidante (83). O DPPH[•] é um radical livre estável, disponível comercialmente, solúvel apenas em solventes orgânicos, apresentando uma coloração violeta com um máximo de absorção UV a 515/517 nm (83,84). Este método exige a atenção a alguns parâmetros, como por exemplo, a exposição à luz, ao oxigénio, o pH e o tipo de solvente (84). A Figura 21 mostra o mecanismo da redução do

DPPH[•], na qual um antioxidante doa um hidrogénio. A formação do DPPH pode ser acompanhada espectrofotometricamente, uma vez que ocorre alteração da cor, passando de violeta a amarelo (83). Esta reação apresenta estequiometria em relação ao número de átomos de hidrogénio absorvidos. Os resultados finais são expressos como valores de IC₅₀, correspondendo à quantidade de antioxidantes necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH (83).

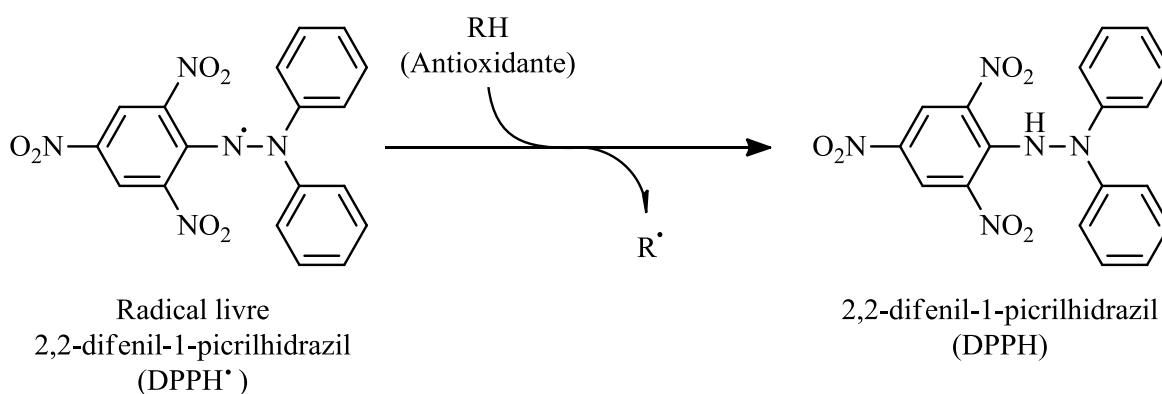


Figura 21 – Mecanismo de reação entre o radical DPPH[•] e compostos antioxidantes (adaptado de: (83)).

3.4. Métodos de extração e análise de compostos

A caracterização dos metabolitos secundários presentes em plantas/algas ou outro tipo de substrato envolve numa primeira etapa a recolha da amostra/substrato a analisar seguida da extração destes mesmos compostos. Geralmente, as algas são colhidas em zonas costeiras ou praias e, de forma a remover quaisquer resíduos de sal, impurezas e epífitas, são lavadas, secas e moídas de forma a assegurar uma amostra homogénea. Estes pré-tratamentos são essenciais para evitar a co-extração de outros componentes, com propriedades semelhantes de solubilidade, bem como para garantir a representatividade da amostra (85).

A escolha do solvente de extração é essencial para a composição final do extrato obtido (86). Existe um grande número de solventes que têm sido utilizados para a remoção de extratáveis, como o hexano, ciclohexano, tolueno, diclorometano, clorofórmio, acetona, metanol, etanol e água. A escolha do solvente, puro ou uma mistura de solventes, depende da polaridade dos compostos que se quer extrair (87). Extratos lipofílicos de diversas

origens, incluindo de algas (3) têm sido extraídos com sucesso usando diclorometano como solvente.

A extração de compostos a partir de amostras sólidas é normalmente realizada por extração sólido-líquido (88). Entre as técnicas utilizadas para este fim, a extração em Soxhlet (Figura 22) tem sido utilizada como técnica de referência (88). Esta é uma técnica relativamente simples e barata que permite extrair quantidades de extrato superiores à maioria dos métodos mais recentes (com fluidos supercríticos, extração por micro-ondas, etc.) (88). Esta técnica tem sido das técnicas convencionais mais usadas para extrair compostos lipofílicos (3,89,90). No entanto, não tem sido adotada para extrair compostos termolábeis, como por exemplo, compostos fenólicos (88). Diversos autores têm optado por isolar este último grupo de compostos por extrações sólido-líquido simples à temperatura ambiente (91–93).

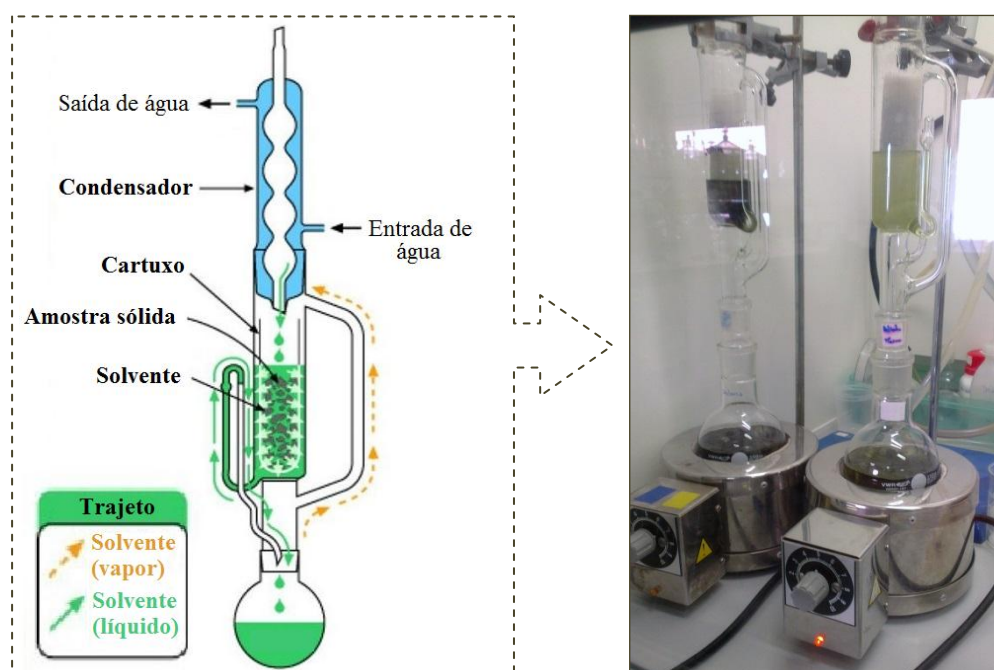


Figura 22 – Esquema do sistema de extração Soxhlet (adaptado de: (94)).

Para além das técnicas convencionais, sólido-líquido e Soxhlet, outras técnicas têm sido aplicadas para extrair compostos bioativos de macroalgas, nomeadamente, a extração com CO₂ supercríticos (SFE), a extração assistida por micro-ondas (MAE), extração

assistida por ultra-sons (UAE), extração acelerada por solvente (ASE) e extração assistida por enzimas (EAE) (34,85,95–99)

A SFE tem sido usada para extrair PUFA's, carotenóides, clorofilas e β -caroteno a partir de algas (85,95,97). Contudo, este método apresenta algumas desvantagens, como o elevado custo do equipamento e a baixa polaridade de CO₂ supercrítico que limita o seu uso às famílias de compostos de mais baixa polaridade (85).

Recentemente, a MAE também tem sido utilizada para extrair compostos bioativos de algas, tais como carotenóides e fucoïdanos, no entanto, esta técnica não é adequada a compostos termolábeis (85,97). A UAE, contrariamente à MAE, é compatível com a extração de compostos sensíveis ao calor. As isoflavonas são um exemplo de compostos extraídos por esta última técnica a partir de macroalgas (85,97).

A ASE tem sido vista como uma técnica promissora para extrair diferentes famílias de compostos de macroalgas (85). Alguns dos estudos já realizados mostraram ser possível aplicar ASE na extração de carotenóides, clorofilas, ácidos gordos e compostos fenólicos a partir de algas (34,85,97–99).

A EAE permite converter matrizes de alga insolúveis em água em extratos solúveis, não sendo necessário recorrer a solventes orgânicos tóxicos (100). A aplicação deste método seguido por outro método de extração dos referidos anteriormente tem demonstrado melhorias significativas nos rendimentos de lípidos totais e na extração da fucoxantina a partir de macroalgas (96). Os extratos polares também têm apresentado teores mais elevados de compostos fenólicos quando aplicada EAE (85).

3.4.1. Análise dos compostos por técnicas cromatográficas

A análise dos extratos lipofílicos e polares é bastante complexa, no entanto, na última década, a caracterização de extratos complexos tem sido facilitada pela evolução das técnicas cromatográficas (101). A cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta eficiência tornaram-se as técnicas mais utilizadas, em particular quando acopladas à espectrometria de massa (MS), conjuntamente com técnicas como a ressonância magnética nuclear (RMN) (82).

O GC-MS é uma técnica versátil, eficiente e sensível para a identificação de componentes de misturas complexas (82,102). Esta técnica distingue-se dos outros tipos de

cromatografia por a fase móvel ser um gás inerte (ou gás de arrasto) e a fase estacionária ser um líquido ou polímero disperso/imobilizado na superfície de um suporte sólido (coluna capilar) (101,103). Para a análise por espectrometria de massa a amostra é ionizada, sendo a técnica de ionização mais comum o impacto eletrónico, pela informação estrutural relevante que fornece para a identificação dos componentes (104,105). Um dos requisitos da análise por GC-MS deste tipo de amostras é a necessidade de uma etapa de derivatização que tem como finalidade aumentar a estabilidade térmica, química e a volatilidade de compostos (82,102). O tipo de derivatização mais comum para a análise de álcoois, ácidos gordos, álcoois de terpenos, esteróis, etc. é a formação de éteres/ésteres de trimetilsililo (TMS) (102). Os grupos TMS também podem melhorar a análise por espectrometria de massa, devido à formação de iões característicos resultantes da fragmentação deste tipo de compostos (102).

Esta técnica é adequada para analisar compostos voláteis e de peso molecular mais baixo e/ou menos polares, e por isso é utilizada para analisar, por exemplo, extratos lipofílicos e também fenólicos, no entanto, neste último caso, apenas é aplicável a compostos fenólicos de peso molecular mais baixo devido à sua maior volatilidade (82,102). A análise de compostos fenólicos de peso molecular mais elevado e/ou mais polares é normalmente feita por HPLC que, por operar com base numa fase móvel líquida é mais adequada para a análise de espécies não voláteis, polares e termolábeis (101,104). Em HPLC-MS a ionização da amostra é normalmente feita por *electrospray*. Esta é considerada uma ionização suave que, contrariamente ao que acontece na ionização por impacto eletrónico, não promove fragmentação da molécula, resultando em espectros mais simples em que se observa essencialmente o ião $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$, consoante se esteja a operar em modo positivo ou negativo (82,104,106). De forma a permitir a obtenção de mais informação estrutural é normalmente usada a técnica de MS^n em que é induzida a fragmentação sucessiva dos iões $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$, e de outros fragmentos daí resultantes (82). A identificação dos compostos é feita por comparação dos resultados de MS^n com os obtidos com padrões, eluídos nas mesmas condições da amostra, e por comparação com dados da literatura (96). Contrariamente ao GC-MS, em HPLC-MS não há bases de dados para comparação. Esta técnica tem sido usada com bastante sucesso na análise de compostos polares, como os compostos fenólicos em plantas, frutos e mesmo em algas (57,93). Finalmente, na análise de compostos fenólicos por HPLC o detetor *diode array*

(DAD) desempenha igualmente, um papel importante uma vez que os espectros de UV-Vis também fornecem informação relevante sobre esta família de compostos (93,104).

4. Materiais e métodos

4.1. Amostras e reagentes

As macroalgas foram fornecidas pela empresa ALGAplus sob as condições indicadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Macroalgas escolhidas e regiões da recolha.

Macroalga	Condições
<i>Himanthalia elongata</i>	Colhida em Mindelo em Setembro em 2013;
<i>Laminaria ochroleuca</i>	Colhida em Mindelo em Março em 2013;
<i>Undaria pinnatifida</i>	Colhida na praia da Barra;

Após a colheita as algas foram lavadas e secas ao ar. De seguida foram moídas/trituradas (1-2 mm) e embaladas em sacos herméticos. Foi determinado teor de humidade para cada espécie apresentando valores entre os 18 a 22%.

Os solventes diclorometano (p.a., $\geq 99\%$ pureza) e metanol (p.a., $\geq 99.99\%$ pureza) foram fornecidos pela Fischer Scientific (Pittsburgh, PA). O ácido clorídrico (p.a., $\geq 37\%$), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (99% pureza), trimetilclorosilano ($\geq 99\%$ pureza), tetracosano ($\geq 99\%$ pureza) e ácido ascórbico ($\geq 99.5\%$ pureza) foram fornecidos pela Fluka Chemie (Madrid, Spain). Hidróxido de potássio (p.a., $\geq 85\%$ pureza), ácido hexadecanóico ($\geq 99\%$ pureza), sulfato de sódio (p.a., $\geq 99\%$ pureza), colesterol (99% pureza), nonadecanol (p.a. $\geq 99\%$ pureza), piridina (p.a., $\geq 99.8\%$ pureza), ácido gálico (pureza $\geq 97.5\%$), reagente Folin-Ciocalteu, 3,5-di-*tert*-4-butil-hidroxitolueno (BHT) (pureza $\geq 99\%$), hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,4-dimetoxibenzaldeído (DMBA) (p.a. 98%) e floroglucinol (p.a. 99 %) foram fornecidos pela Sigma Chemicals Co. (Madrid, Spain). Ácido acético glacial (99 %) e carbonato de sódio (p.a. 98%) foram fornecidos pela Panreac Química S.A. (Barcelona, Espanha). A acetona (p.a. 99.5%) foi fornecida pela Chem Lab Analytical.

4.2. *Extração de compostos lipofílicos*

Cerca de 20 g de cada amostra de macroalga foi extraída por Soxhlet com diclorometano durante 6h. O solvente foi de seguida evaporado até à secura com um evaporador rotativo. Os extratos lipofílicos foram pesados e os resultados foram expressos em percentagem por peso seco. Os extratos foram obtidos em triplicado.

4.2.1. *Hidrólise alcalina*

Foram realizadas hidrólises alcalinas de forma a detetar ácidos gordos, álcoois alifáticos e esteróis que pudessem estar presentes nos extratos na forma esterificada (por, exemplo, triglicerídeos, ésteres de esteróis, etc.).

Aproximadamente 20 mg de extrato foram dissolvidos em 10 mL de 1M KOH em 10% de metanol. Esta mistura foi aquecida a 100 °C, sob atmosfera de azoto, durante 1h. A mistura foi de seguida arrefecida e acidificada com HCl 1M a pH \approx 2. Após a acidificação, realizaram-se 3 extrações líquido-líquido com diclorometano, evaporando-se de seguida o solvente até à secura. As hidrólises foram feitas em triplicado e a metodologia usada foi adaptada da literatura (107).

4.2.2. *Análise GC-MS*

Antes da análise por GC-MS, três alíquotas de cada extrato seco (extratos lipofílicos antes e após a hidrólise alcalina) foram submetidas a um processo de derivatização. Cerca de 20 mg de cada extrato foi dissolvido em 250 μ L de piridina com 0.6 mg de padrão interno (tetracosano) e foi trimetilsililado, pela adição de 250 μ L de *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e 50 μ L de trimetilclorossilano (TMSCl), usado como catalisador. Os compostos com grupos funcionais hidroxilo e carboxílico foram convertidos em éteres e ésteres de trimetilsililo, respetivamente. A mistura reacional foi colocada em banho de óleo a 70 °C durante 30 minutos.

A análise por GC-MS foi realizada com recurso a um cromatógrafo equipado com um espectrómetro de massa GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, U.S.A.). A separação dos

compostos foi realizada numa coluna capilar DB-1 J&W (30 m x 0.32 mm de diâmetro interno e 0.25 µm de espessura de filme), e utilizando hélio como gás de arraste (35 cm/s).

As condições cromatográficas foram as seguintes: temperatura inicial 80 °C durante 5 min; aumento de 4 °C/min até aos 260 °C, seguido de um aumento de 2 °C/min até aos 285 °C, temperatura que foi mantida durante 8 min; temperatura do injetor 250 °C; temperatura de “transferline” 290 °C; razão de split 1:50. O espectrómetro de massa foi usado no modo de impacto eletrónico a uma energia de 70 eV e os dados obtidos foram recolhidos a uma taxa de 1 scan/s, na gama de m/z 33-700. A fonte de ionização foi mantida a 250 °C.

Os compostos foram identificados como derivados de TMS por comparação dos seus espectros de massa com bases de dados (NIST14), pelos tempos de retenção característicos nas condições experimentais descritas, por comparação dos seus perfis de fragmentação com a literatura e por injeção de padrões.

Para a análise quantitativa, o GC-MS foi calibrado com padrões representativos das principais famílias de extratos lipofílicos (ácido hexadecanóico, nonadecanol e colesterol), tendo sido obtidos fatores de resposta em relação ao padrão interno, o tetracosano. Cada alíquota foi injetada em duplicado.

4.3. *Extração de compostos polares*

Os extratos polares foram obtidos usando duas metodologias de extração adaptadas da literatura (32,108). Numa das extrações foram usados os resíduos sólidos resultantes da extração com diclorometano (108). Foram pesadas 0.2 g de resíduo de alga que foi suspenso em 10 mL de acetona-água (7:3, v/v) contendo ácido ascórbico (0.3 %, m/v), durante 1 hora à temperatura ambiente. A fase líquida foi separada do resíduo por centrifugação, a 3600 rpm durante 10 min repetindo o processo mais três vezes. A acetona da fase líquida foi sendo removida com corrente de azoto. O extrato aquoso foi novamente centrifugado (3600 rpm, 15 min) para remover possíveis resíduos, decantado e congelado. A água foi removida por liofilização e os extratos quantificados em percentagem de peso seco (108). Para análise por HPLC, os extratos foram dissolvidos em acetona-água (7:3) (grau HPLC), em concentrações finais de extrato de 6 e 80 mg/mL, sendo de seguida filtrados com um filtro de seringa PTFE de porosidade 0.45 µm (108).

Numa segunda metodologia de extração foram pesadas cerca de 0.1 g de macroalga à qual foi adicionado 10 mL de metanol-água-ácido acético (30:69:1, v/v/v) contendo ácido ascórbico (0.2%, m/v), levando de seguida a mistura ao vortéx durante 2 minutos (32). As amostras foram colocadas em banho de água com agitação constante a 70 °C durante 50 min. De seguida, foram centrifugadas a 3600 rpm durante 15 min, o sobrenadante/extrato foi separado do resíduo sólido e o solvente foi removido por evaporação a baixa pressão. Uma alíquota de 1 mL de sobrenadante foi retirada antes de evaporar e filtrada através de um filtro PTFE de 0.45 µm para posterior análise por HPLC. Os resultados foram expressos em percentagem de peso seco (32). Todos os extratos foram obtidos em triplicado.

4.3.1. Quantificação do teor de fenóis totais (TPC)

A quantificação do teor de fenóis totais (TPC) dos extratos polares foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu (109). Os extratos secos foram dissolvidos em água, com concentrações de 0.15 mg/mL para os extratos de acetona:H₂O e concentrações entre 0.24 e 0.28 mg/mL para os extratos MeOH:H₂O:AcOH. De seguida, a 500 µL de extrato, adicionou-se 2.5 mL de reagente Folin-Ciocalteu, previamente diluído com água (1:10, v/v) e 2.0 mL de carbonato de sódio aquoso (Na₂CO₃, 75 g/L). Cada mistura foi mantida durante 5 minutos a 50 °C e, após arrefecimento, a sua absorvância foi lida contra um branco, a 760 nm usando um espectrofotómetro UV-Vis Evolution 220 (Thermo Scientific). Foram preparadas soluções padrão de ácido gálico (AG, 10 a 90 µg/mL) e de floroglucinol (FG, 10 a 90 µg/mL) para se obter curvas de calibração. Os resultados foram expressos em g de equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de extrato e g de equivalentes de floroglucinol (EFG)/g de extrato. As amostras foram analisadas em triplicado.

4.3.2. Ensaio 2,4-dimetoxibenzaldeído (DMBA)

Os extratos obtidos foram ainda analisados pelo método DMBA, referido na literatura como um método simples para uma estimativa do teor de florotaninos totais. A metodologia seguida foi adaptada da literatura (20). O reagente de trabalho foi preparado

através de uma mistura de volumes iguais de DMBA (2%, m/v) e HCl (6%, v/v) preparados em ácido acético glacial. A 750 µL desta mistura foram adicionadas alíquotas de 150 µL de extrato. A reação ocorreu à temperatura ambiente, no escuro e durante 60 minutos. A absorvância foi determinada a 515 nm num espectrofotômetro UV-Vis Evolution 220 (Thermo Scientific). A determinação quantitativa dos florotaninos foi feita a partir de uma reta de calibração obtida com uma solução padrão de floroglucinol (FG, 1.0 a 3.6 µg/mL). Os resultados foram expressos em g de equivalentes de floroglucinol (EFG)/g de extrato. O procedimento foi realizado em triplicado.

4.3.3. Atividade antioxidante dos extratos polares – Ensaio DPPH

A atividade antioxidante dos extratos polares foi determinada pela sua capacidade de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os extratos secos foram previamente dissolvidos em água. Adicionou-se 0.25 mL de DPPH (0.95 mM em metanol) e 2.75 mL de metanol a alíquotas de 1 mL de extrato, correspondendo a concentrações finais entre 7-77 µg/mL e 11-133 µg/mL para os extratos acetona:H₂O e MeOH:H₂O:AcOH, respetivamente. As misturas permaneceram no escuro durante 30 min, à temperatura ambiente e a sua absorvância foi determinada a 517 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis Evolution 220 (Thermo Scientific) e em comparação com um controlo sem extrato. As absorvâncias foram lidas contra um branco. O ácido ascórbico e o 3,5-di-*terc*-4-butil-hidroxitolueno (BHT) foram utilizados como compostos de referência.

A atividade antioxidante foi expressa como a percentagem de redução do radical DPPH e calculada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Redução DPPH} = \frac{\text{Abs controlo} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs amostra}} \times 100 \%$$

Os valores de IC₅₀ foram determinados a partir dos gráficos de redução do DPPH vs concentração dos extratos. Estes valores são definidos como a concentração de extrato necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de radicais DPPH, sendo expressos em µg/mL. As medições foram realizadas em triplicado. A atividade

antioxidante foi ainda expressa em mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/mg de extrato e em mg de equivalentes de BHT (EBHT)/mg de extrato.

4.3.4. Análise por HPLC-MS

A análise da fração polar foi realizada num sistema de UHPLC, contendo um autosampler Accela de loop variável (capacidade para 200 frascos) com uma temperatura controlada de 15 °C, bomba Accela 600 LC e um detetor PDA Accela 80 Hz (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, U.S.A.). A separação dos compostos foi feita numa coluna Kinetex C18 (50 mm x 2.1 mm x 1.7 µm) fornecida por Phenomenex, com um caudal de 0.5 mL.min⁻¹ e uma temperatura controlada de 45 °C. O volume de injeção foi de 10 µL e a fase móvel consistiu em água:acetonitrilo (99:1, v/v) (A) e acetonitrilo (B), ambas com 0.1% de ácido fórmico. O perfil do gradiente aplicado foi o seguinte: 0-3 min: 2%B, 3-18 min: 2-30%B, 18-20 min: 30-100%B, 20-24 min: 100-2%B, seguindo-se de um gradiente isocrático de 3 min para reequilíbrio da coluna, antes da injeção seguinte. A deteção foi realizada no detetor de díodos, com aquisição de espectros de UV entre 200-600 nm e foram ainda adquiridos cromatogramas a comprimento de onda fixo de 280 e 340 nm. Antes da injeção, cada extrato foi dissolvido na mistura de solventes de extração (solventes com pureza HPLC), de forma a obter concentrações do extrato final de 6 e 80 mg/mL e, filtrado através de um filtro de seringa PTFE de 0.45 µm.

A análise MS foi realizada num espectrómetro de massa *ion trap* LCQ Fleet (ThermoFinnigan, San Jose, CA, U.S.A.), equipado com uma fonte de ionização *electrospray* e operado em modo negativo. O fluxo de gás nebulizador (azoto) e de gás auxiliar (azoto) foi ajustado para 40 e 10 (unidades arbitrárias), respetivamente. A voltagem (de pulverização) aplicada ao spray na fonte foi de 5 kV e a temperatura do capilar foi de 350 °C. A voltagem capilar e da lente foram fixadas em -25 V e -125 V, respetivamente. A análise CID-MSⁿ foi realizada através dos iões percursores de massa selecionada com uma gama de m/z de 100-2000. A largura de iões percursores isolados foi de 1.0 unidades de massa. O tempo de varredura foi de 100 ms e a energia de colisão foi otimizada entre 20 e 35 (unidades arbitrárias), utilizando hélio como gás de colisão. A aquisição de dados foi realizada usando o sistema de dados Xcalibur® data system (ThermoFinnigan, San Jose, CA, U.S.A.).

4.3.5. Análise por UV-Visível

Os espectros de UV-Vis foram obtidos a partir dos extratos de acetona:H₂O e de MeOH:H₂O:AcOH dissolvidos em água com concentrações a variarem entre 1.4-1.5 e 2.2-2.5 mg/mL, respetivamente, num espectrofotómetro UV-Vis Evolution 220 (Thermo Scientific), numa faixa de comprimentos de onda entre 200 a 600 nm.

4.3.6. Análise por Ressonância magnética nuclear RMN de ¹³C e ¹H

Os espectros de RMN de ¹H e RMN de ¹³C foram obtidos usando acetona e água (extratos acetona:H₂O) e metanol e água (extratos MeOH:H₂O:AcOH) como solventes deuterados, num espectrómetro Brüker AMX 300 a operar numa frequência de 300.13 MHz para ¹H e 75.47 MHz para ¹³C. Os deslocamentos químicos foram registados em partes por milhão (ppm) relativamente à ressonância do tetrametilsilano, usado como referência interna.

5. Resultados e discussão

Este trabalho teve como principal objetivo identificar e quantificar os compostos lipofílicos e polares (nomeadamente os compostos fenólicos) a partir de macroalgas castanhas recolhidas na costa portuguesa.

As macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida* foram sujeitas a extração em soxhlet com diclorometano, para extrair compostos lipofílicos e a dois processos de extração sólido/líquido adaptados da literatura, um em acetona:água (7:3) e outro em metanol:água:ácido acético (30:69:1), para extrair compostos polares (32,108).

Os extratos lipofílicos obtidos foram analisados por GC-MS; enquanto os extratos da fração polar foram analisados por HPLC-MS e ainda avaliados quanto ao seu teor de fenóis totais, teor de florotaninos totais e atividade antioxidante.

5.1. Extração de compostos lipofílicos

A extração de compostos lipofílicos foi realizada por extração Soxhlet com diclorometano e os extratos obtidos foram derivatizados, formando esteres trimetilsililados, para posteriormente serem analisados por GC-MS.

5.1.1. Rendimento global das extrações Soxhlet

Os rendimentos das extrações com diclorometano das algas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida* encontram-se na Tabela 9. Estes rendimentos não diferiram muito entre si, apresentando a macroalga *U. pinnatifida* o maior valor ($1.74 \pm 0.08\%$), seguindo-se a *H. elongata* (1.01 ± 0.02) e por último a *L. ochroleuca* (0.59 ± 0.07). Estes valores estão na mesma gama dos descritos na literatura para estas macroalgas castanhas (33). Contudo, verificou-se um rendimento mais elevado nas macroalgas *H. elongata* e *U. pinnatifida*, do que os descritos na literatura (33), enquanto que a *L. ochroleuca* apresentou um rendimento mais baixo do que o encontrado anteriormente por Sánchez-Machado *et al.* (33). Estas diferenças podem estar relacionadas com o clima, estação do ano, assim como,

diferentes condições de extração aplicadas, como por exemplo, extração Soxhlet em vez de extração sólido-líquido e o uso de diferentes solventes de extração (clorofórmio/metanol).

Tabela 9 – Rendimentos de extração com diclorometano das macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*.

Macroalgas	Rendimento de extração (%)
<i>H. elongata</i>	1.01 ± 0.02
<i>L. ochroleuca</i>	0.59 ± 0.07
<i>U. pinnatifida</i>	1.74 ± 0.08

5.1.2. Identificação e quantificação dos extratos lipofílicos por GC-MS

A composição química dos extratos das três macroalgas foi estudada em detalhe por GC-MS. Na Figura 23 está representado um cromatograma de GC-MS da fração lipofílica derivatizada da macroalga *H. elongata* representativo dos extratos obtidos. Os compostos identificados podem ser agrupados em diferentes grupos, nomeadamente, em ácidos gordos, álcoois alifáticos de cadeia longa e esteróis, conforme ilustrado pelo cromatograma de GC-MS (Figura 23). A identificação detalhada dos compostos lipofílicos e a sua correspondente quantificação está representada na Tabela 10.

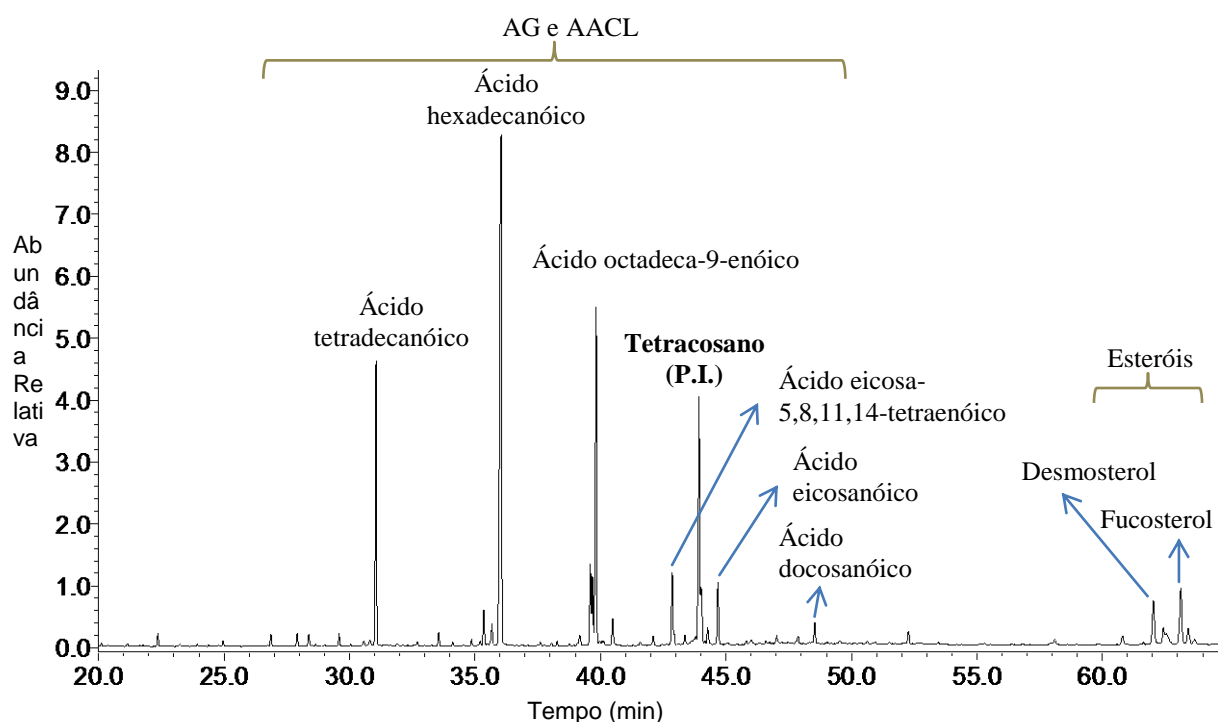


Figura 23 – Cromatograma do extrato em diclorometano derivatizado da macroalga *H. elongata*.

Tabela 10 – Compostos detetados nos extratos lipofílicos das macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*.

	tR	mg/g extrato			mg/kg peso seco		
		<i>H. elongata</i>	<i>L. ochroleuca</i>	<i>U. pinnatifida</i>	<i>H. elongata</i>	<i>L. ochroleuca</i>	<i>U. pinnatifida</i>
Ácidos gordos		305.8	262.3	171.7	3102.8	1550.1	2987.9
<i>Saturados</i>		<i>193.8</i>	<i>161.6</i>	<i>121.6</i>	<i>1965.8</i>	<i>955.2</i>	<i>2116.8</i>
Ácido nonanóico	16.4	0.7	0.7	0.5	6.7	4.0	8.5
Ácido decanóico	19.6	0.1	0.2		0.5	1.2	
Ácido dodecanóico	25.6	0.1	0.2	0.1	1.2	1.2	1.6
Ácido tetradecanóico	31.0	45.6	41.8	20.0	462.5	247.2	347.3
Ácido pentadecanóico	33.5	2.3	2.9	1.1	23.6	16.9	19.3
Ácido hexadecanóico	36.0	120.2	92.6	76.6	1219.7	547.0	1333.3
Ácido heptadecanóico	38.2	0.9	0.9	0.5	9.4	5.1	8.2
Ácido octadecanóico	40.3	5.3	6.2	9.7	53.4	36.5	168.3
Ácido eicosanóico	44.6	11.4	14.2	11.4	115.7	84.0	198.8
Ácido docosanóico	48.5	4.1	0.8	0.4	41.6	4.5	6.3
Ácido tetracosanóico	52.2	2.6	0.4	0.3	26.4	2.2	5.3
Ácido 3-hidroxi-hexadecanóico	40.3	---	---	0.6	---	---	11.3
Ácido 22-hidroxi-docosanóico	55.3	0.5	0.9	0.5	5.2	5.4	8.7

	tR	mg/g extrato			mg/kg peso seco		
		H. <i>elongata</i> 105.0	L. <i>ochroleuca</i> 93.4	U. <i>pinnatifida</i> 44.3	H. <i>elongata</i> 1065.1	L. <i>ochroleuca</i> 552.0	U. <i>pinnatifida</i> 771.2
<i>Insaturados</i>							
Ácido hexadeca-9-enóico	35.3	5.8	9.5	1.4	58.6	56.3	24.3
Ácido heptadeca-10-enóico	37.6	0.7	0.7	0.2	7.4	4.0	3.3
Ácido octadeca-6,9,12,15-tetraenóico	39.1	---	5.5	---	---	32.4	---
Ácido octadeca-9,12-dienóico	39.6	13.3	5.1	7.2	135.0	30.2	125.3
Ácido octadeca-9,12,15-trienóico	39.6	10.2	3.6	3.3	103.5	21.4	58.1
Ácido octadeca-9-enóico	39.8	59.9	57.1	27.3	607.8	337.6	474.6
Ácido eicosa-5,8,11,14-tetraenóico	42.8	12.2	8.3	3.7	123.4	48.9	63.7
Ácido eicosa-5,8,11,14,17-pentaenóico	42.9	1.2	2.8	0.7	12.2	16.7	11.7
<i>Diácidos</i>							
		7.1	7.3	5.7	71.9	43.0	99.8
Ácido 2-butenedióico	16.1	0.7	0.4	1.3	6.7	2.5	22.6
Ácido pentanedióico	17.8	1.1	1.0	0.6	11.2	5.8	9.8
Ácido hexanedióico	21.1	0.6	2.1	1.2	5.8	12.4	20.3
Ácido octanedióico	26.8	2.1	2.2	1.5	21.5	12.9	26.7
Ácido nonanedióico	29.5	2.2	1.3	1.0	22.5	7.5	17.7
Ácido decanedióico	32.1	0.2	---	---	1.8	---	---
Ácido undecanedióico	34.5	0.2	0.3	0.2	2.3	1.8	2.7
Álcoois alifáticos de cadeia longa		1.5	1.9	0.8	15.5	11.5	13.6
Hexadecan-1-ol	34.1	0.5	0.8	0.3	5.6	4.4	5.6
Octadec-9-en-1-ol	38.0	0.6	0.7	0.3	6.4	4.0	4.5
Octadecan-1-ol	38.7	0.3	0.5	0.2	3.5	3.1	3.5
Triacontan-1-ol	63.6	tr	---	---	tr	---	---
Monoglicerídeos		1.2	1.7	2.6	12.7	10.0	44.9
2,3-dihidroxi-propil hexadecanoato	47.8	1.2	1.0	1.9	12.7	5.9	33.6
2,3-dihidroxi-propil 9-octadecenoato	50.9	---	0.2	0.2	---	1.0	3.4
2,3-dihidroxi-propil octadecanoato	51.5	---	0.5	0.5	---	3.1	7.8
Esteróis		34.9	12.8	16.9	354.2	75.6	294.3
24-Metilenocolesterol	60.8	2.5	4.1	7.7	25.4	24.2	133.3
Desmosterol	61.9	11.4	3.4	4.4	115.9	20.3	76.0
Fucosterol	63.0	14.6	2.9	2.1	148.3	17.2	36.9
Campesterol	63.3	5.0	1.4	1.7	50.7	8.1	30.1
Brassicasterol	63.6	1.4	1.0	1.0	13.9	5.8	18.0
Outros		3.9	2.1	4.3	39.5	12.4	74.7
Pentadecano	21.1	---	tr	---	---	tr	---
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	30.5	0.9	1.1	1.8	9.0	6.5	30.9
Neofitadieno	30.8	1.1	1.0	---	11.2	6.0	---

	tR	mg/g extrato			mg/kg peso seco		
		<i>H. elongata</i>	<i>L. ochroleuca</i>	<i>U. pinnatifida</i>	<i>H. elongata</i>	<i>L. ochroleuca</i>	<i>U. pinnatifida</i>
Fitol	39.1	1.9	---	2.5	19.2	---	43.9
TOTAL		347.4	280.8	196.3	3524.6	1659.6	3415.4

tR- Tempo de retenção
tr (trace) = vestígios

A abundância relativa das principais famílias de compostos identificados nos extratos em diclorometano das macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e a *U. pinnatifida* está representada na Figura 24. Os ácidos gordos (saturados e insaturados) e os esteróis são as famílias maioritárias da fração lipofílica das três algas analisadas. Cerca de 50% dos compostos extraídos correspondem a ácidos gordos saturados (Figura 24). Para além destas duas principais famílias de compostos foram também identificados álcoois alifáticos de cadeia longa e monoglicerídeos, entre outros compostos. A *H. elongata* foi a alga que apresentou um teor mais elevado de UFAs enquanto a *U. pinnatifida* apresentou o teor mais elevado de SFAs (Figura 24).

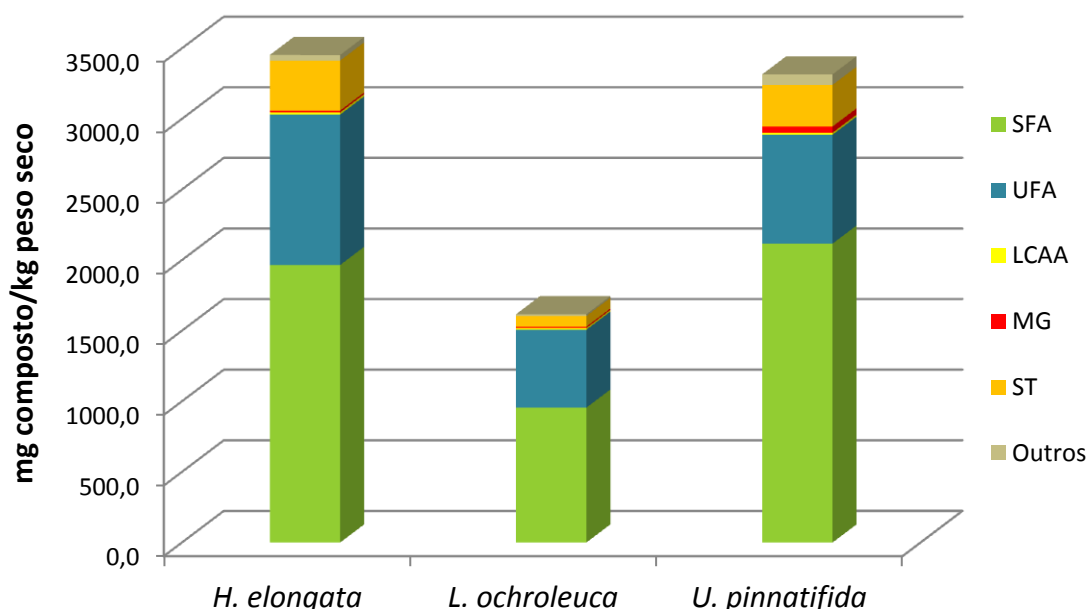


Figura 24 – Principais famílias de compostos lipofílicos identificados nos extratos em diclorometano das algas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*. SFA – ácidos gordos saturados, UFA – ácidos gordos insaturados, LCAA – álcoois alifáticos de cadeia longa, ST – esteróis e MG – monoglicerídeos.

5.1.2.1 Ácidos gordos

Apesar das diferenças morfológicas que existem entre as espécies de algas castanhas analisadas, estes organismos apresentaram perfis de ácidos gordos semelhantes (Tabela 10). O total de ácidos gordos saturados identificados variou entre 955.2 mg/kg peso seco para a *L. ochroleuca* e 2116.8 mg/kg peso seco para a *U. pinnatifida*. O total de ácidos gordos insaturados foi de 552.0, 771.2 e 1065.1 mg/kg peso seco para a *L. ochroleuca*, *U. pinnatifida* e *H. elongata*, respetivamente.

Os ácidos gordos na forma de ésteres trimetilsililados são facilmente identificados devido ao seu padrão de fragmentação típico. Para além dos picos correspondentes ao ião molecular $[M]^+$ e ao ião $[M-15]^+$, este último resultante da perda de um grupo metilo do grupo TMS, os iões com m/z 73 e 75, correspondentes aos fragmentos $[(CH_3)_3Si]^+$ e $[(CH_3)_2SiOH]^+$ respetivamente, também são muito comuns nos espectros de massa dos derivados TMS. Outros fragmentos proeminentes, característicos dos espectros de massa dos ésteres trimetilsililados de ácidos gordos saturados e mono-insaturados, são os iões a m/z 117, 129, 132 e 145 representados no espectro de massa do ácido hexadecanóico trimetilsililado na Figura 25 (110,111).

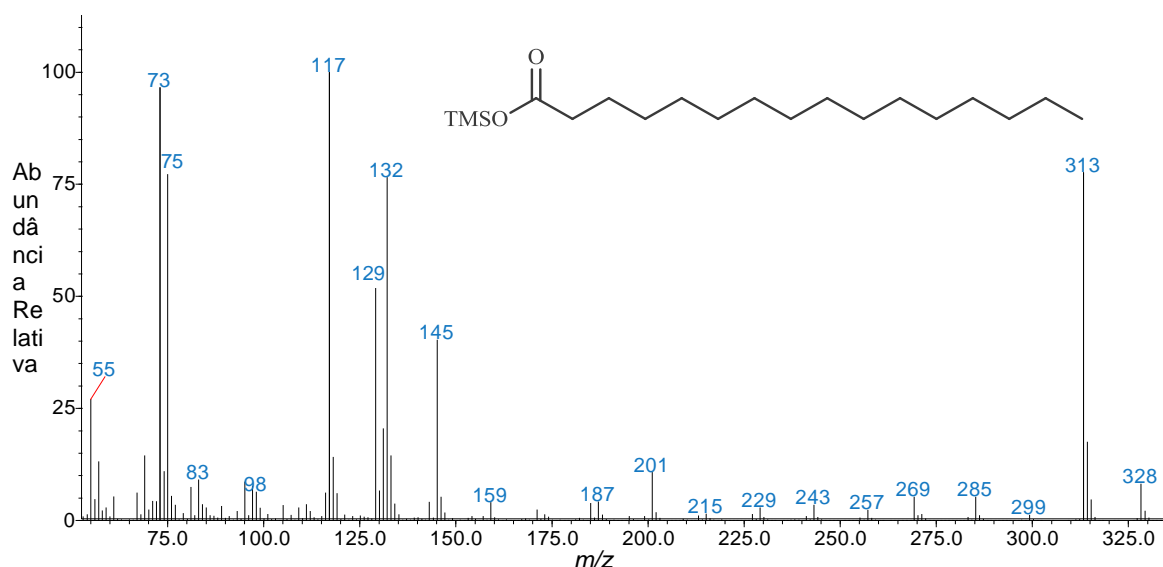
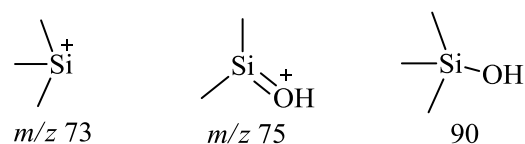


Figura 25 – Espectro de massa do derivado TMS do ácido hexadecanóico.

O espectro de massa de ácidos gordos insaturados-TMS apresentam os mesmos fragmentos referidos anteriormente para os ácidos gordos saturados, e ainda, o pico

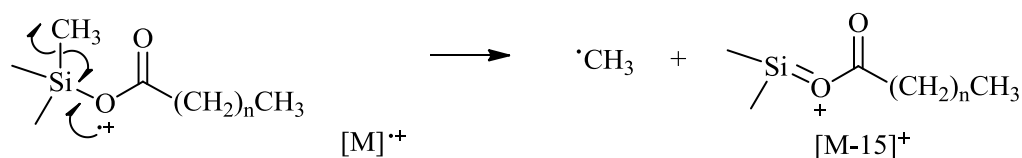
correspondente ao fragmento $[M-90]^+$, resultante da perda do grupo $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{OH}]^+$ (110). A grande diferença nos espectros de massa dos insaturados, em comparação com os saturados, é a abundância relativa do pico correspondente ao fragmento $[M-15]^+$. À medida que aumenta o grau de insaturação, a abundância relativa do íon $[M-15]^+$ diminui (110).

A formação dos fragmentos característicos dos ácidos gordos a m/z 117, 132, 129, 145 e $[M-15]^+$ está exemplificada na Figura 26 (110). O fragmento a m/z 132 resulta de um rearranjo do tipo McLafferty que, ao perder o radical metilo origina um novo fragmento com m/z 117 (Figura 26 *b*) e *c*)) (103,110). O íon a m/z 145 surge também de um rearranjo do tipo McLafferty que pode ainda sofrer uma outra fragmentação, através da transferência de um próton, com eliminação de um CH_4 , formando o íon a m/z 129 (Figura 26 *d*) e *e*)) (110).

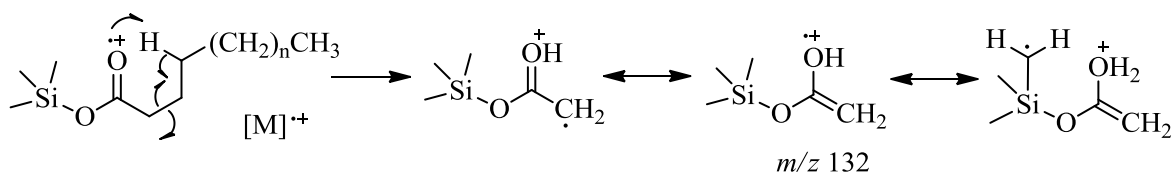


Fragmentos caraterísticos

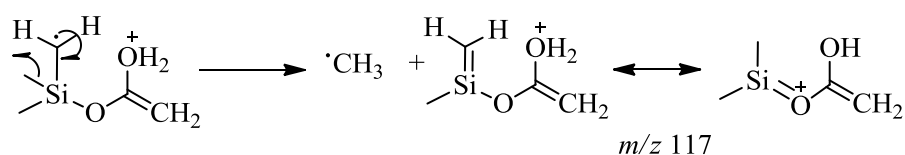
a)



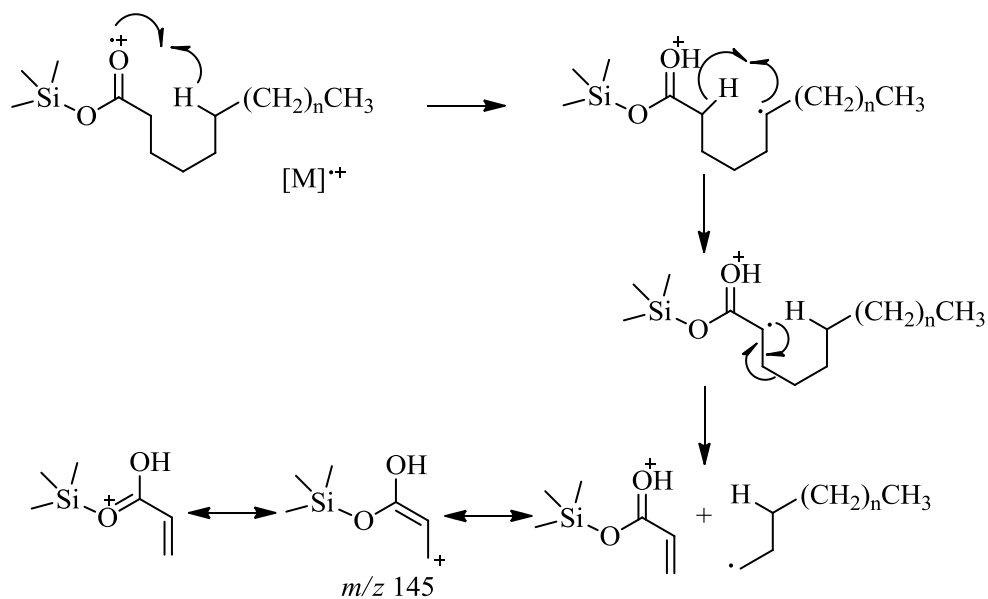
b)



c)



d)



e)

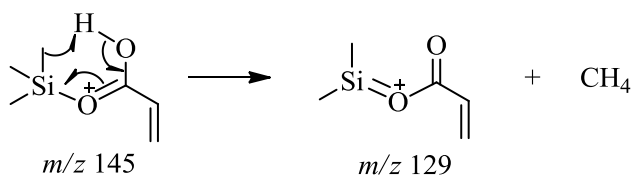


Figura 26 – Mecanismos de fragmentação do ião fragmento $[M-15]^+$ e dos iões a m/z 117, 129, 132 e 145.

Os principais ácidos gordos encontrados nas três macroalgas foram os ácidos tetradecanóico, hexadecanóico, eicosanóico, octadeca-9-enóico (ω -9), os PUFA C18, nomeadamente, o ácido octadeca-9,12-dienóico (ω -6) e o ácido octadeca-9,12,15-trienóico (ω -3) e os PUFA C20, tais como, o ácido eicosa-5,8,11,14-tetraenóico (ω -6) e o ácido eicosa-5,8,11,14,17-pentaenóico (ω -3). Esta composição de ácidos gordos encontra-se de acordo com outros estudos já realizados em algas castanhas (33,112,113). Para todas as algas, o ácido gordo mais abundante foi o ácido hexadecanóico, encontrando-se em menor quantidade na *L. ochroleuca* (547.0 mg/kg peso seco) e em maior abundância na *U. pinnatifida* (1333.3 mg/kg peso seco). Este composto foi já referido na literatura como o ácido gordo mais abundante destas macroalgas (112–114). O ácido tetradecanóico foi o segundo ácido gordo saturado mais abundante detetado também nas três macroalgas e com valores entre 247.2 mg/kg de peso seco (*L. ochroleuca*) e 462.5 mg/kg de peso seco (*H. elongata*). A abundância deste ácido gordo em diferentes algas castanhas já foi referida na literatura (112). A *U. pinnatifida* apresentou ainda quantidades significativas dos ácidos eicosanóico (198.8 mg/kg de peso seco) e octadecanóico (168.3 mg/kg de peso seco).

Relativamente aos ácidos gordos insaturados a *H. elongata* foi a que apresentou um teor mais elevado (1065.1 mg/kg de peso seco), seguida da *U. pinnatifida* (771.2 mg/kg de peso seco) e da *L. ochroleuca* (552.0 mg/kg de peso seco). A quantidade de UFAs observado na macroalga *U. pinnatifida* é relativamente inferior à que foi detetada para a mesma espécie proveniente de outras origens geográficas (112).

O ácido gordo insaturado encontrado em maior abundância nas três macroalgas, foi o ácido octadeca-9-enóico com valores a variarem entre 337.6 (*L. ochroleuca*) e 607.8 mg/kg de peso seco (*H. elongata*). Ácidos gordos essenciais, como os ácidos octadeca-9,12-dienóico (ω -6) e octadeca-9,12,15-trienóico (ω -3), e precursores de eicosanóides, eicosa-5,8,11,14-tetraenóico (ω -6) e o ácido eicosa-5,8,11,14,17-pentaenóico (ω -3) também foram detetados nas macroalgas em estudo. O ácido octadeca-6,9,12,15-tetraenóico (ω -3) apenas foi detetado na *L. ochroleuca* com um valor de 32.4 mg/kg de peso seco, contrariamente ao observado na literatura, onde este ácido gordo já foi identificado tanto na *U. pinnatifida* como na *H. elongata* (33,112,114). Apesar de já existirem na literatura outros estudos sobre a composição de ácidos gordos em macroalgas castanhas (33,113–115), a sua maioria apenas apresenta as quantidades relativas dos

compostos identificados, não tendo permitido assim uma comparação quantitativa mais exaustiva.

Alguns diácidos foram detetados pela primeira vez nestas algas, nomeadamente, os ácidos 2-butenedióico, pentanedióico, hexanedióico, octanedióico, nonanedióico, decanedióico e undecanedióico com um teor total a variar entre 43.0 mg/kg de peso seco (*L. ochroleuca*) e 99.8 mg/kg de peso seco (*U. pinnatifida*).

Os diácidos, tais como os ésteres TMS dos ácidos gordos saturados apresentam o pico $[M-15]^+$ e os picos a m/z 73, 75, 117, 129, 132, 145. Os fragmentos caraterísticos que permitem a distinção dos ácidos gordos são os iões a m/z 147, 204 e 217 e $[M-131]^+$ (116). Estes fragmentos podem ser identificados no espectro de massa do ácido nonanedióico (Figura 27).

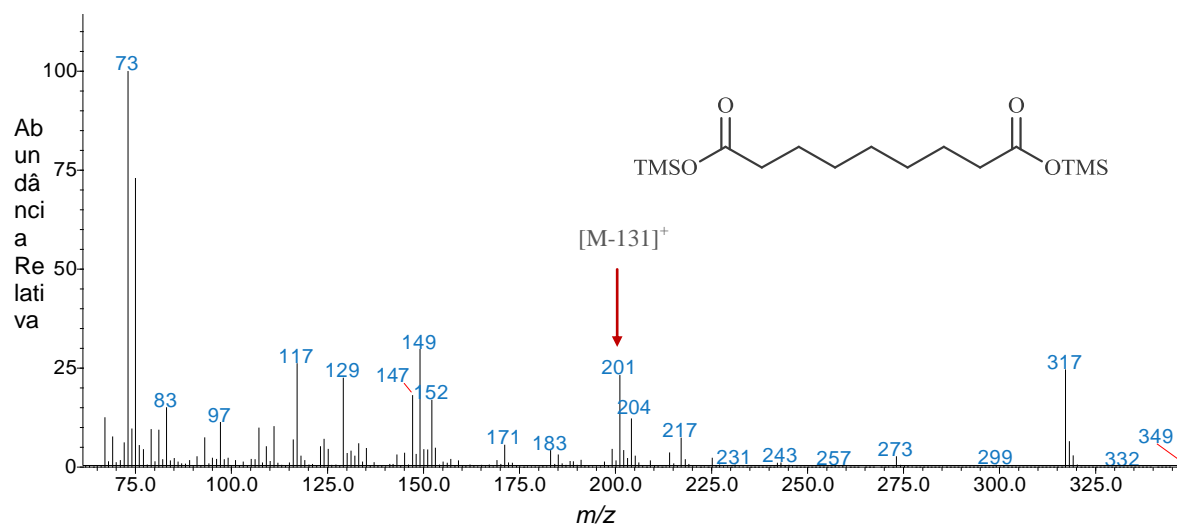


Figura 27 – Espectro de massa do derivado TMS do ácido nonanedióico.

A *U. pinnatifida* foi a alga que apresentou um teor mais elevado de diácidos (99.8 mg/kg de peso seco), sendo o ácido octanedióico o diácido mais abundante com um teor de 26.7 mg/kg de peso seco, seguindo-se o ácido 2-butenedióico (22.6 mg/kg de peso seco) e o ácido hexanedióico (20.3 mg/kg de peso seco). A *H. elongata* foi a alga com o segundo teor mais elevado de diácidos (71.9 mg/kg de peso seco), seguindo-se da *L. ochroleuca* (43.0 mg/kg de peso seco). Os diácidos mais abundantes na *H. elongata* foram o ácido octanedióico e o nonanedióico (21.5 e 22.5 mg/kg de peso seco, respetivamente) e na *L. ochroleuca* foram os ácidos hexanedióico e o octanedióico (12.4 e 12.9 mg/kg de peso

seco, respetivamente). O ácido decanedióico apenas foi encontrado na *H. elongata* (Tabela 10).

5.1.2.2 Álcoois alifáticos de cadeia longa

Os álcoois alifáticos de cadeia longa representam uma pequena fração do total dos extratáveis identificados por GC-MS nas macroalgas em estudo.

Estes compostos foram identificados com base na literatura (117,118) e nas bases de dados do equipamento. Os fragmentos caraterísticos para a identificação deste tipo de compostos são o $[M-15]^+$ e o fragmento a m/z 75, este último apresentando elevada intensidade, como pode ser observado no espectro de massa do hexadecan-1-ol (Figura 28) (117,118).

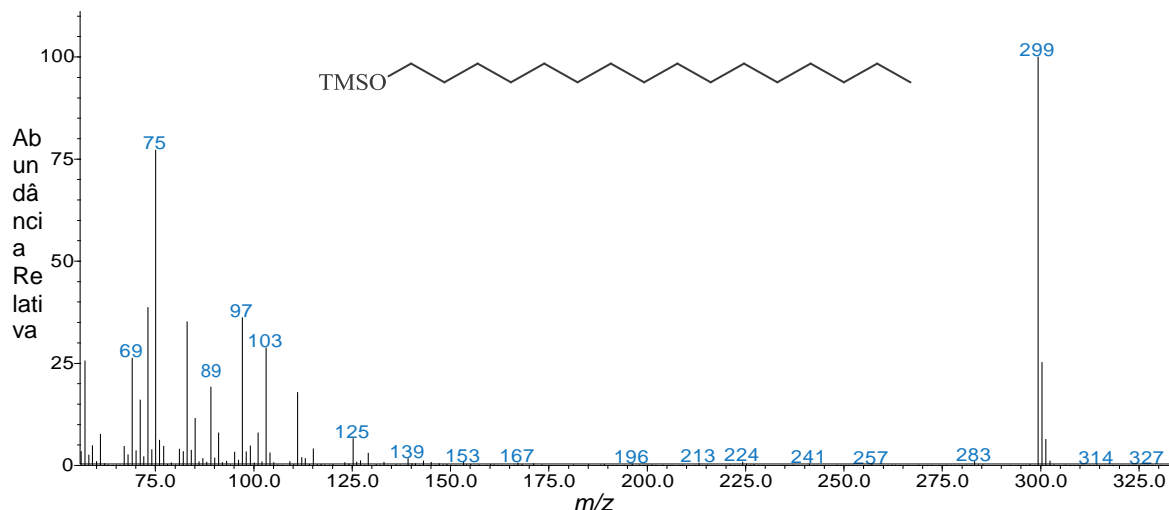


Figura 28 – Espectro de massa do derivado TMS hexadecan-1-ol.

O ião a m/z 103, correspondente ao fragmento $[H_2C=OSi(CH_3)_3]^+$ (Figura 29) também é um fragmentos típico dos álcoois alifáticos trimetilsililados na posição terminal (álcoois primários) (103,118).

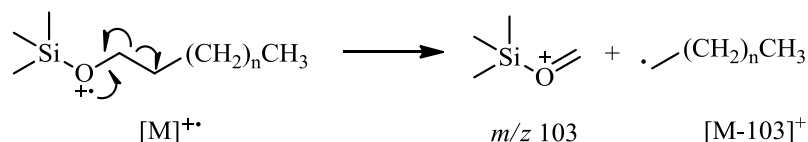


Figura 29 – Mecanismo de fragmentação do íon a m/z 103 característico dos derivados de TMS de álcoois alifáticos primários.

A macroalga com teores mais elevados de ACL foi a *H. elongata*, com um total de 15.5 mg/kg peso seco. O octadec-9-en-1-ol foi o ACL mais abundante (6.4 mg/kg de peso seco), seguindo-se o hexadecan-1-ol (5.6 mg/kg de peso seco) e o octadecan-1-ol (3.5 mg/kg de peso seco). A *L. ochroleuca* e a *U. pinnatifida* apresentaram valores inferiores de ACL (11.5 e 13.6 mg/kg peso seco, respetivamente). O hexadecan-1-ol foi o ACL maioritário encontrado nas macroalgas *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*, enquanto o octadecan-1-ol foi o que apresentou valores mais baixos nas três macroalgas. Para a *H. elongata* foram ainda encontrados vestígios do ACL triacontan-1-ol (Tabela 10).

5.1.2.3 Esteróis

Os esteróis foram a segunda classe mais abundante dos compostos lipofílicos detetados nas três macroalgas (Figura 24).

Os espectros de massa dos derivados de esteróis-TMS caracterizam-se pela presença de um grande número de picos com distintas abundâncias relativas. Estes compostos foram identificados com base no seu padrão de fragmentação (110,119–122). Em geral, os espectros de massa dos derivados de TMS dos esteróis apresentam um pico correspondente ao peso molecular, caso contrário, o seu peso pode ser deduzido a partir do íon $[M-15]^+$. Os íões a m/z 73 e 75 são comuns a todos os derivados, estando portanto também presentes nos espectros de massa de esteróis. Outro fragmento característico dos derivados TMS dos esteróis é o íon $[M-90]^+$, correspondente à eliminação do grupo trimetilsilanol, que após perda de mais um grupo metilo resulta no fragmento $[M-105]^+$ (120). Os íões a m/z 129 e $[M-129]^+$, que correspondem à perda do grupo TMS conjuntamente com três carbonos do anel A (carbono 1, 2 e 3), permitem obter informação adicional sobre a estrutura molecular do composto em estudo (121–123).

Na Figura 30 encontra-se representado o espectro de massa do derivado trimetilsililado do fucosterol, onde podem ser observados os picos característicos acima referidos.

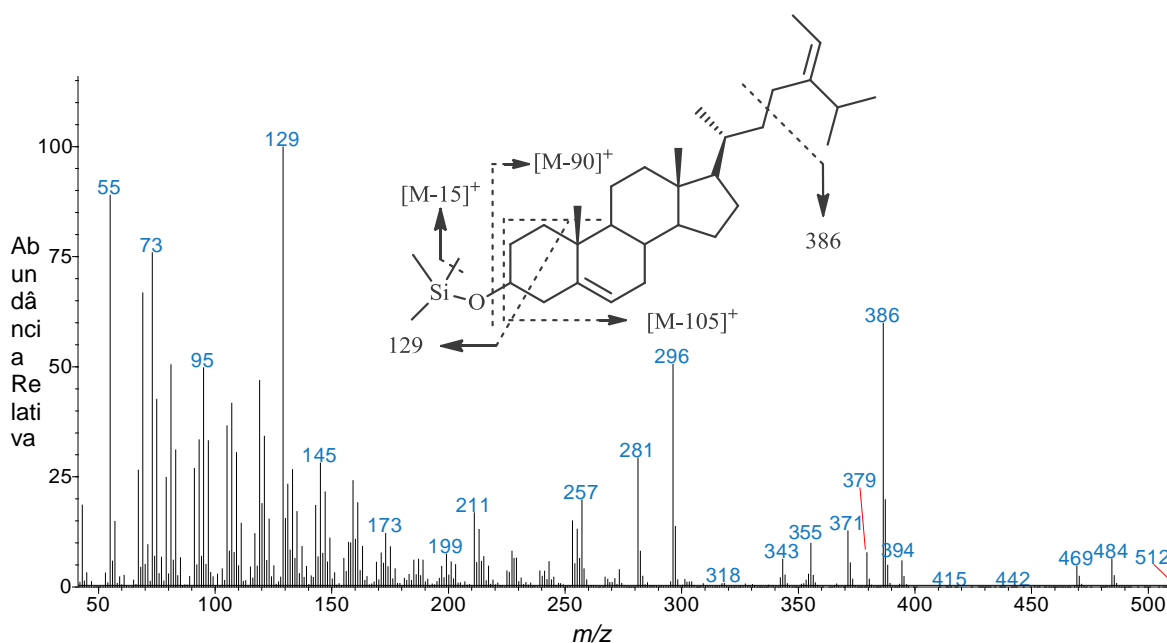


Figura 30 – Espectro de massa do derivado TMS do fucosterol.

A *H. elongata* foi a macroalga com quantidades mais elevadas de esteróis, apresentando 354.2 mg/kg de peso seco. O fucosterol (Figura 30) é o esterol mais abundante nesta alga, correspondendo a 148.3 mg/kg de peso seco. A *U. pinnatifida* apresentou um total de esteróis de 294.3 mg/kg de peso seco, enquanto que a *L. ochroleuca* apresentou 75.5 mg/kg de peso seco (Tabela 10). O esterol maioritário para estas macroalgas foi o 24-metilenocolesterol. Todos os esteróis identificados nos extratos lipofílicos das macroalgas em estudo foram anteriormente encontrados em macroalgas castanhas (4,124). Os compostos desmosterol, fucosterol e campesterol foram ainda identificados como constituintes de macroalgas castanhas da costa portuguesa (4). As macroalgas analisadas apresentaram quantidades de fucosterol e campesterol entre 17.2-148.3 e 8.1-50.7 mg/kg de peso seco, respetivamente. Estes valores são ligeiramente inferiores aos valores obtidos para outras macroalgas castanhas (4). No entanto, foi observada uma abundância de desmosterol entre 20.3 (*L. ochroleuca*) e 115.9 mg/kg de peso seco (*H. elongata*), valor consideravelmente superior aos relatados na literatura para macroalgas castanhas (4). A análise de esteróis nas macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca*

e *U. pinnatifida* foi já reportada na literatura, no entanto apenas a presença do fucosterol e alguns vestígios de campesterol foram referenciados (50).

Os extratos de diclorometano das macroalgas em estudo, foram submetidos a hidrólise alcalina e sililação e, posteriormente, analisados por GC-MS. Foram detetados os mesmos compostos antes da hidrólise (Tabela 10), no entanto, com abundâncias relativas inferiores às reportadas para os extratos sem hidrólise. Estes resultados são desprovidos de sentido, pelo que será necessário no futuro repetir estes ensaios para confirmar se as algas em estudo possuem ou não quantidades de ácidos gordos e álcoois esterificados.

5.2. Extração de compostos polares

Foram realizadas extrações sólido-líquido de otimização, baseadas em estudos já realizados, onde se variou a temperatura, solventes e/ou mistura de solventes, tempo de extração e presença/ausência de agentes estabilizantes (32,57,58,108). Conforme os resultados obtidos, selecionaram-se dois métodos de extração para a fração polar, a extração acetona:H₂O (7:3, v/v) contendo 0.3 % de ácido ascórbico, durante 1 hora à temperatura ambiente e a extração e MeOH:H₂O:AcOH (30:69:1, v/v/v) contendo 0.2% de ácido ascórbico, durante 50 min a 70 °C (32,108).

5.2.1. Rendimento global das extrações de compostos polares

Os rendimentos de extração das macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida* dos extratos obtidos com acetona:H₂O MeOH:H₂O:AcOH estão apresentados na Tabela 11.

A extração acetona:H₂O foi realizada após extração da fração solúvel com diclorometano, que foi responsável pela remoção de 0.59 a 1.74 % de peso de macroalga, enquanto a extração MeOH:H₂O:AcOH foi realizada sem qualquer extração prévia. Os rendimentos obtidos pela extração acetona:H₂O para as diferentes algas variaram entre 88.73-92.33%, enquanto que os rendimentos de extração de MeOH:H₂O:AcOH apresentaram um rendimento de extração inferior, com valores entre 52.67-76.66%.

Tabela 11 – Rendimento das extrações acetona:água e metanol:água:ácido acético das macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*.

Macroalgas	Acetona:H ₂ O com 0.3% de Ác. Ascórbico (7:3)	MeOH:H ₂ O:AcOH com 0.2% de Ác. Ascórbico (30:69:1)
<i>H. elongata</i>	88.93	62.60
<i>L. ochroleuca</i>	92.33	76.66
<i>U. pinnatifida</i>	88.73	52.67

*Os resultados correspondem à média de três ensaios com desvio padrão inferior a 0,05.

O extrato MeOH:H₂O:AcOH apresentou rendimentos de extração inferiores ao rendimento apresentado por Rodríguez-Bernaldo *et al.* (32) nas mesmas condições de extração. A macroalga que apresentou melhor rendimento, em ambas as extrações, foi a *L. ochroleuca*.

5.2.2. Quantificação do teor de fenóis totais e florotaninos

A quantificação do teor de fenóis totais (TPC) e de florotaninos, determinado pelo método Folin-Ciocalteu e pelo método DMBA, respetivamente, estão apresentados na Tabela 12. O teor de fenóis totais obtidos a partir da mistura de solventes acetona:H₂O encontram-se na gama de 524.03-635.69 g equivalentes de ácido gálico (EAG)/kg de peso seco e 364.27-449.57 g equivalentes de floroglucinol (EFG)/kg de peso seco. Os extratos obtidos a partir da mistura de MeOH:H₂O:AcOH apresentaram TPCs inferiores, com valores entre 163.94-198.16 g EAG/kg de peso seco e 145.06-184.11 g EFG/g de peso seco.

Tabela 12 – Quantificação do teor de fenóis totais e florotaninos dos extratos acetona:água e metanol:água:ácido acético das macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*.

		TPC				DMBA	
		g EAG/g de extrato	g EAG/kg peso seco	g EFG/g de extrato	g EFG/kg peso seco	g EFG/g de extrato	g EFG/kg peso seco
Acetona:H₂O (0.3 % ác. ascórbico)	<i>H. elongata</i>	0.71	635.69	0.51	449.57	0.00174	1.55
	<i>L. ochroleuca</i>	0.69	635.66	0.49	448.04	0.00161	1.48
	<i>U. pinnatifida</i>	0.59	524.03	0.41	364.27	0.00175	1.55
MeOH:H₂O: ÁcOH (0.2% ác. ascórbico)	<i>H. elongata</i>	0.32	198.16	0.29	184.11	0.00126	0.79
	<i>L. ochroleuca</i>	0.21	163.94	0.19	145.06	0.00088	0.68
	<i>U. pinnatifida</i>	0.30	156.19	0.27	143.30	0.00132	0.69

*Os resultados correspondem à média de três ensaios com desvio padrão inferior a 0,05.

A quantificação de florotaninos foi determinada pelo método de DMBA. O reagente DMBA reage especificamente com fenóis substituídos nas posições 1,3- e 1,3,5-, como por exemplo o floroglucinol e os florotaninos, formando pigmentos tri-fenilmetanos após substituição eletrofílica (20). As três macroalgas apresentaram valores entre 1.48-1.55 g EFG/kg de peso seco (acetona:H₂O) e 0.68-0.79 g EFG/kg de peso seco (MeOH:H₂O:AcOH). Comparativamente com o que já foi relatado para outras macroalgas castanhas, os extratos acetona:H₂O apresentaram um conteúdo de florotaninos significativamente superior, enquanto que a extração MeOH:H₂O:AcOH apresentou valores semelhantes aos da literatura (20).

Estes resultados permitiram-nos verificar que as três macroalgas em estudo, apesar de serem de diferentes espécies e colhidas em épocas diferentes, apresentaram teores de fenóis totais e de florotaninos muito semelhantes entre si. Os extratos de acetona:H₂O apresentaram sempre valores mais elevados de teor de fenóis totais e florotaninos.

5.2.3. Atividade antioxidante

Nos últimos anos, os antioxidantes naturais têm sido considerados uma boa alternativa aos antioxidantes sintéticos, normalmente usados para prevenir doenças e oxidação de sistemas alimentares complexos. Como já foi referido anteriormente, os compostos naturais podem substituir aditivos sintéticos tais como o BHA e BHT (109).

A Tabela 13 mostra a atividade antioxidante dos extratos obtidos expressa em termos de quantidade de extrato necessária para reduzir em 50% a concentração de DPPH (IC₅₀), sendo os resultados apresentados em mg de equivalentes de ácido ascórbico (EAA)/g de peso seco de macroalga e em mg de equivalentes de BHT (EBHT)/g de peso seco de macroalga. Os valores de IC₅₀ dos extratos das macroalgas, bem como os valores obtidos para o ácido ascórbico e BHT encontram-se também descritos na Tabela 13 para fins comparativos.

Tabela 13 – Atividade antioxidante dos extratos acetona:água e metanol:água:ácido acético das macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*

		<i>Atividade antioxidante</i>				
		IC ₅₀ [µg/mL]	mg EAA/mg de extrato	mg EAA/g peso seco	mg EBHT/mg de extrato	mg EBHT/g peso seco
Ácido ascórbico		4.87 ± 0.42				
BHT		9.34 ± 0.51				
Acetona:H₂O (0.3 % ác. ascórbico)	<i>H. elongata</i>	6.99 ± 0.12	0.70	619.39	1.34	1187.49
	<i>L. ochroleuca</i>	6.57 ± 0.17	0.74	684.01	1.42	1311.37
	<i>U. pinnatifida</i>	7.64 ± 0.05	0.64	566.01	1.22	1085.14
MeOH:H₂O: AcOH (0.2% ác. ascórbico)	<i>H. elongata</i>	12.50 ± 0.62	0.39	243.92	0.75	467.65
	<i>L. ochroleuca</i>	17.24 ± 0.09	0.28	216.52	0.54	415.11
	<i>U. pinnatifida</i>	13.81 ± 0.31	0.35	185.73	0.68	356.08

*Os resultados correspondem à média de três ensaios com desvio padrão inferior a 0,05.

Os extratos acetona:H₂O revelaram uma atividade antioxidante consideravelmente mais elevada do que a obtida para o BHT e inferior à do ácido ascórbico. Os valores de IC₅₀ da *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida* foram 6.99, 6.57 e 7.64 µg/mL, respetivamente. Os extratos MeOH:H₂O:AcOH apresentaram uma atividade antioxidante inferior aos extratos acetona:H₂O e ainda, inferior aos antioxidantes comerciais BHT e ácido ascórbico.

5.2.4. Identificação de compostos polares

Os cromatogramas resultantes da análise por HPLC-MS-DADⁿ dos extratos acetona:H₂O e MeOH:H₂O:AcOH das macroalgas em estudo (ilustrado na Figura 31, para a *H. elongata*) não permitiram a detecção de nenhum composto fenólico. Os únicos picos detetados devem-se aos solventes utilizados na extração e preparação da amostra e o pico final corresponde a contaminantes. Estes resultados não são concordantes com os testes espectrofotométricos (TPC e DMBA), nem com a atividade antioxidante observada.

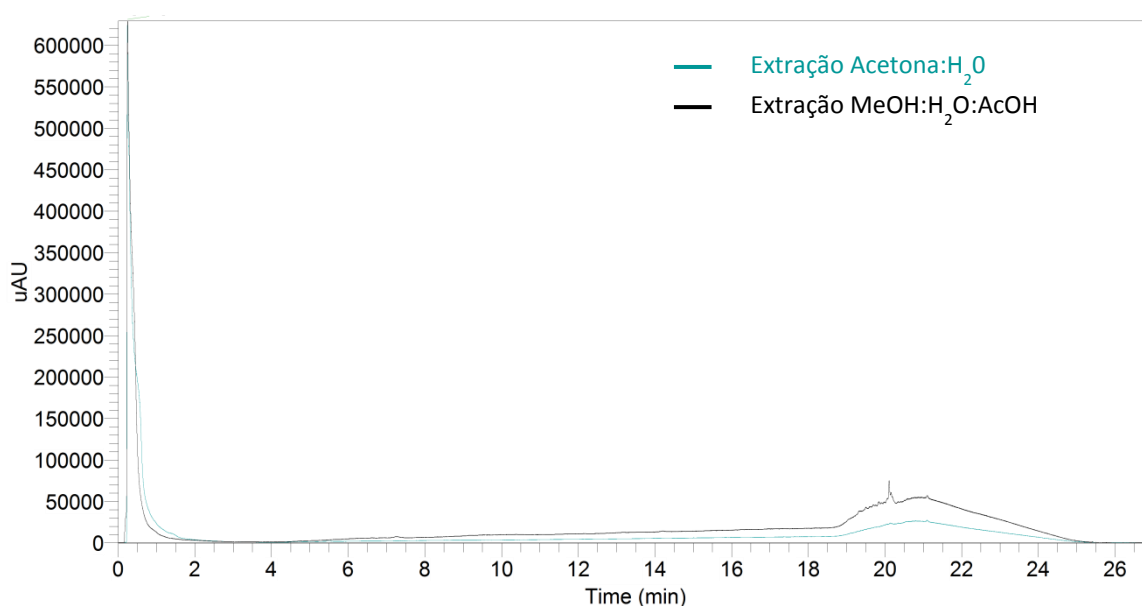


Figura 31 – Cromatograma de HPLC-UV a 280 nm da macroalga *H. elongata* obtido a partir dos extratos acetona:H₂O e MeOH:H₂O:AcOH

De forma a tentar esclarecer esta contradição, recorreu-se à espectrometria UV-Vis e à análise por RMN de ¹³C e de ¹H dos extratos acetona:H₂O e MeOH:H₂O:AcOH. O espectro de UV-Vis do extrato acetona:H₂O das macroalgas em estudo encontra-se apresentado na Figura 32, observando-se um máximo de absorvância a 260-280 nm o que é perfeitamente compatível com a presença de compostos fenólicos, nomeadamente ácidos fenólicos, catequinas e florotaninos que apresentam um máximo de absorção a 260 e 280 nm (125–127).

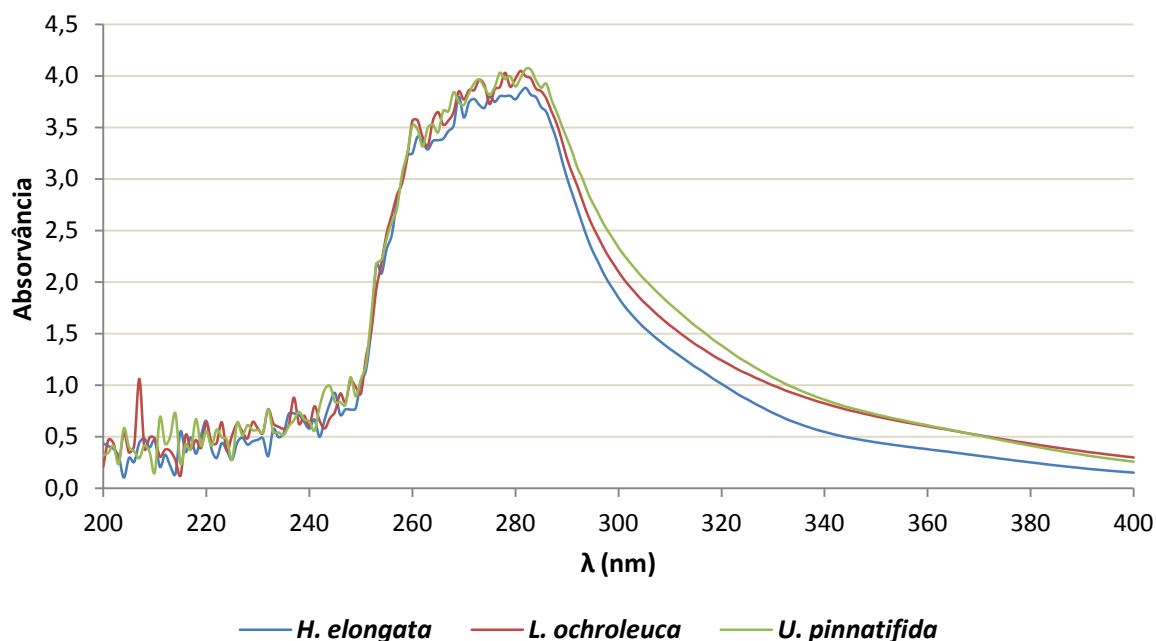


Figura 32 – Espectro UV-Vis dos extratos acetona:H₂O para as algas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*.

De forma a obter informação mais detalhada sobre a composição química das frações polares obtidas, foram efetuadas análise de RMN de ¹³C e de ¹H destas frações. Os espectros de RMN de ¹³C e de ¹H do extrato acetona:H₂O da alga *L. ochroleuca* estão apresentados na Figura 33 e 34, respetivamente. No espectro de RMN de ¹³C observam-se seis ressonâncias de ¹³C com valores entre 62.09 a 75.61 ppm correspondentes a carbonos ligados a grupos -OH, que poderiam ser atribuídos a açúcares, no entanto, não se observam ressonâncias por volta dos ≈100 ppm, que são representativas do carbono anomérico (α -C1 e β -C1) de formas cíclicas de açúcares (128). Por outro lado, o espectro apresenta uma resolução muito elevada, comparativamente com os espectros de polissacarídeos descritos em algas (129,130). Comparativamente aos espectros de compostos fenólicos e florotaninos, o espectro de RMN de ¹³C (Figura 33) também não apresenta desvios químicos característicos dos anéis aromáticos representativos destas estruturas complexas (vários sinais entre ≈ 65 a 160 ppm) (131–133).

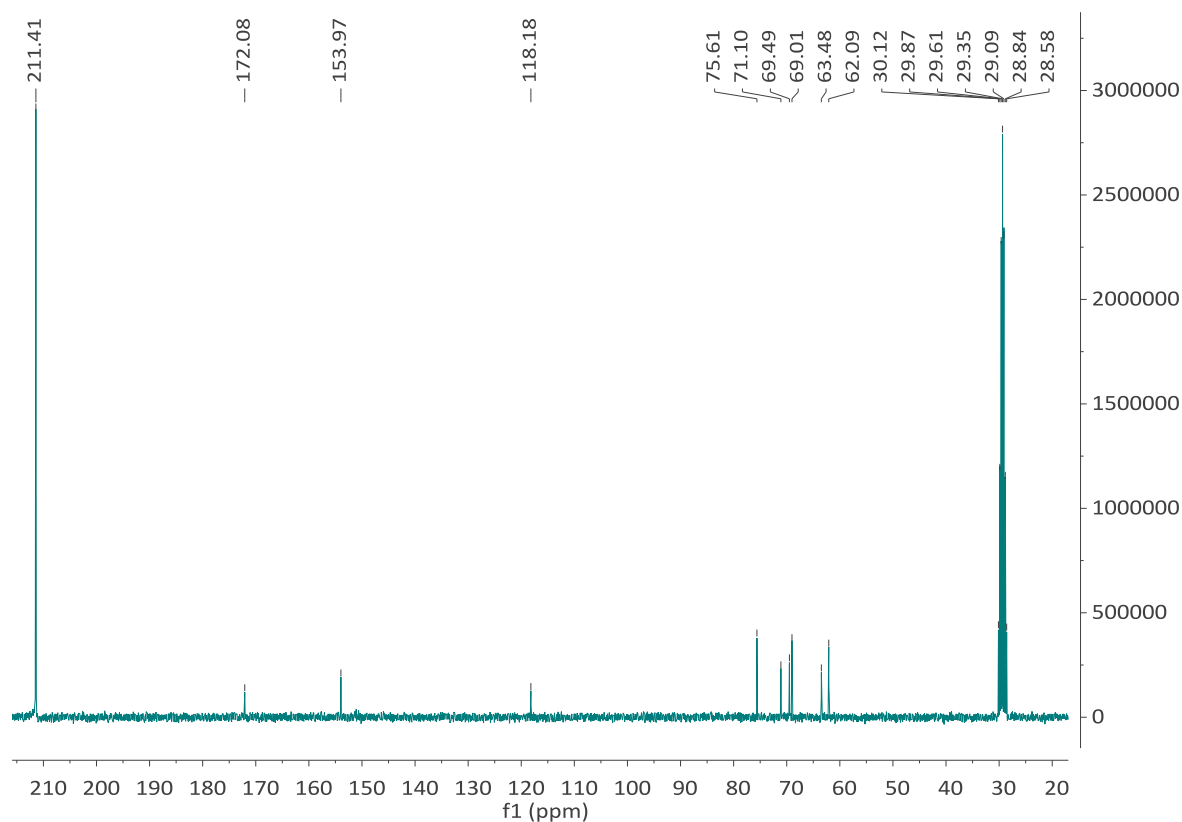


Figura 33 – Espectro de RMN de ^{13}C do extrato acetona: H_2O da *L. ochroleuca*.

No espectro de RMN de ^1H detetaram-se sinais na zona dos hidrogénios alifáticos, no entanto, confirma-se a ausência de carbonos anoméricos, uma vez que não se observam sinais por volta dos 4.5-5.5 ppm representativos dos $\beta\text{-H}$ e $\alpha\text{-H}$ (134,135). Também não se verificam ressonâncias de ^1H aromáticos apresentando um espectro muito limpo (131,132,136). Não foi possível, assim, confirmar por RMN a presença de compostos fenólicos nas frações obtidas.

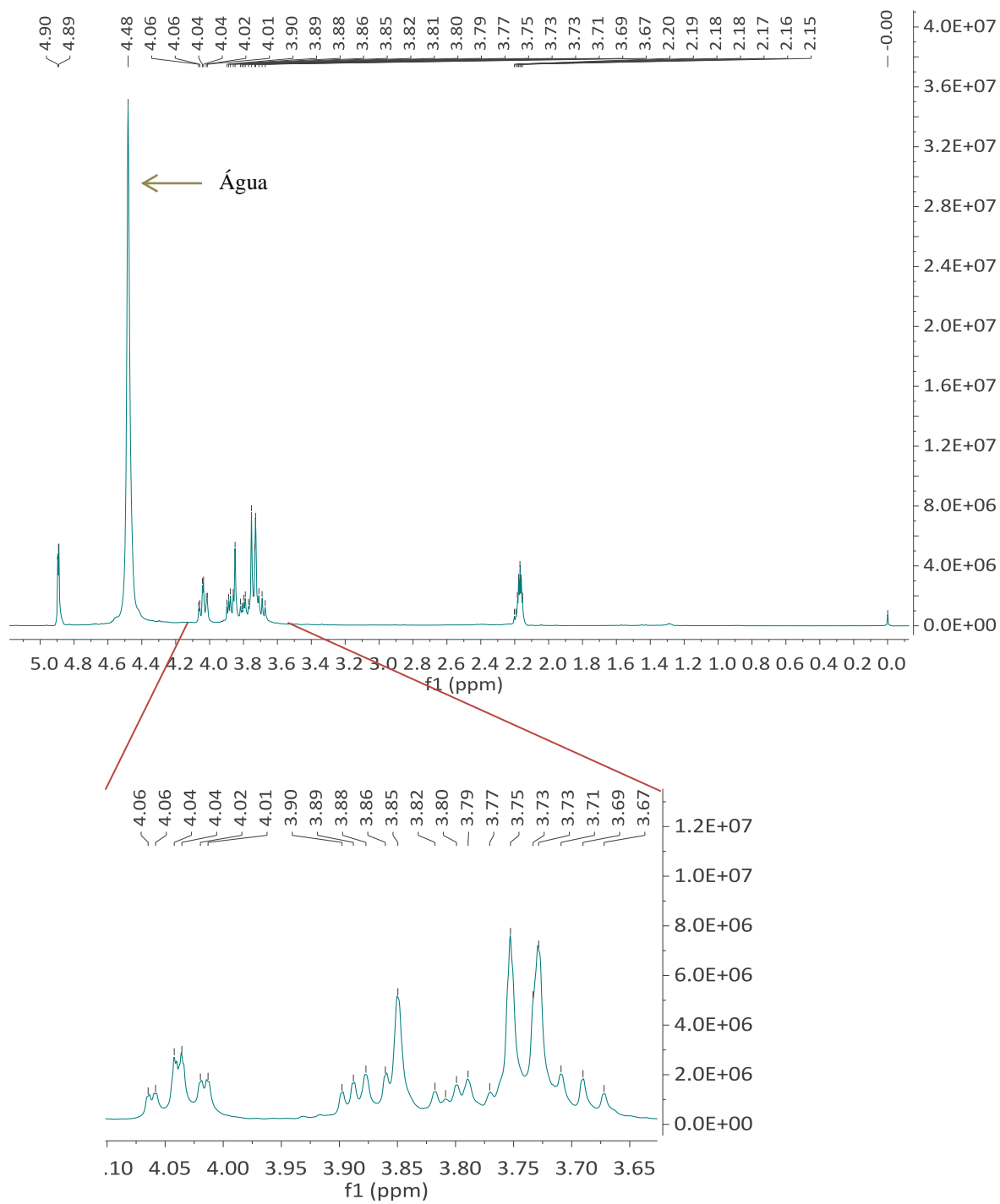


Figura 34 – Espectro de RMN de ^1H do extrato acetona: H_2O da *L. ochroleuca*.

6. Conclusões e trabalhos futuros

No âmbito deste trabalho foram estudados por GC-MS os extratos em diclorometano das macroalgas *H. elongata*, *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida* colhidas na costa portuguesa. Nestes extratos foram possíveis identificar 44 compostos, com destaque os ácidos gordos saturados e insaturados e esteróis, e ainda alguns diácidos, álcoois alifáticos de cadeia longa e monoacilgliceróis. O ácido hexadecanóico foi o composto mais abundante identificado nos extratos, seguido pelo ácido tetracosanóico. Os esteróis predominantes foram o fucosterol, o desmosterol e o 24-metilenocolesterol. No geral, a composição química das espécies estudadas demonstrou ser muito semelhante.

A análise por GC-MS após hidrólise alcalina mostrou um decréscimo de todos os compostos analisados, o que não fazendo sentido deverá ser objeto de uma análise mais aprofundada numa perspetiva futura.

Foram também estudados os extratos polares, obtidos por extração com acetona:H₂O e com MeOH:H₂O:AcOH. A análise dos extratos pelos métodos de Folin-Ciocalteu, do DMBA e do DPPH revelaram teores de fenóis totais e de florotaninos e atividade antioxidante consideráveis. No entanto, e embora a análise de UV-Vis das amostras evidencie bandas de absorção compatíveis com a presença de compostos fenólicos, a análise destes por HPLC-MS e por RMN de ¹³C e de ¹H, não permitiu confirmar a presença destes compostos. Assim, para confirmar (ou não) a presença destes compostos nos extratos em estudo, será necessário numa fase seguinte realizar alguns ensaios com compostos modelo de forma a melhor compreender o seu comportamento nas condições de extração e análise cromatográficas usadas. Como trabalho futuro propõe-se também otimizar condições de fracionamento/purificação da fração fenólica presente nos extratos polares obtidos.

7. Bibliografia

1. Pangestuti R., Kim S.-K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J Funct Foods*. 2011,3(4):255–66.
2. Direção Geral de política do Mar. Estratégia Nacional Para o Mar 2013-2020. <http://www.dgpm.mam.gov.pt/Pages/default.aspx> (15 de Novembro de 2015).
3. Santos S.A.O., Vilela C., Freire C.S.R., Abreu M.H., Rocha S.M., Silvestre A.J.D. Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals. *Food Chem*. 2015,183:122–8.
4. Lopes G., Sousa C., Bernardo J., Andrade P.B., Valentão P., Ferreres F., Mouga T. Sterol Profiles in 18 Macroalgae of the Portuguese Coast. *J Phycol*. 2011,47(5):1210–8.
5. Marques W.A. Evolução do Comércio Internacional português da pesca e outros produtos do mar (1º Semestre de 2014 e 2015). Lisboa, Portugal; 2015.
6. Dellasala D.A. Oceans and Global Change: One Blue Planet. *Ref Modul Earth Syst Environ Sci*. 2013,(1):1–3.
7. Abad M.J., Bermejo P. Bioactive Natural Products From Marine Sources. *Stud Nat Prod Chem*. 2001,25:683–755.
8. Dias D.A., Urban S., Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 1; 2012,2(2):303–36.
9. Pal A., Kamthania M.C., Kumar A. Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds - A Review. *Open Access Libr J*. 2014,1:e752.
10. Pereira L. Guia Ilustrado das Macroalgas: Conhecer e reconhecer algumas espécies da flora portuguesa. Imprensa da Universidade de Coimbra; 2009.
11. Pereira L. Littoral of Viana do Castelo – ALGAE (Bilingue). Câmara Municipal de Viana do Castelo; 2010. p. 68.
12. Domínguez H. Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. Domínguez H, editor. Oxford, UK: Woodhead Publishing Limited; 2013.
13. Pereira L. A Review of the Nutrient Composition of Selected Edible Seaweeds - Chapter 2. In: Pomin VH, editor. “Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses.” Coimbra: Nova Science Publishers Inc.; 2011. p. 15–47.
14. Guiry, M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org> (5 de Dezembro de 2015).
15. Pereira L. As Algas Marinhas e Respectivas Utilidades. Universidade de Coimbra; 2008.
16. McHugh D.J. A guide to the seaweed industry-FAO Fisheries Technical Paper 441. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 2003. p. 105.
17. Cardozo K.H.M., Guaratini T., Barros M.P., Falcão V.R., Tonon A.P., Lopes N.P., Campos S., Torres M. a., Souza A.O., Colepicolo P., Pinto E. Metabolites from algae with economical impact. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2007,146(1-2):60–78.
18. Pereira L. Littoral of Viana do Castelo – ALGAE. Uses in agriculture, gastronomy and food industry

(Bilingue). Câmara Municipal de Viana do Castelo; 2010.

19. Rodrigues D., Sousa S., Silva A., Amorim M., Pereira L., Rocha-Santos T.A.P., Gomes A.M.P., Duarte A.C., Freitas A.C. Impact of enzyme- and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown, and green seaweeds from the central west coast of Portugal. *J Agric Food Chem.* 2015,63(12):3177–88.
20. Lopes G., Sousa C., Silva L.R., Pinto E., Andrade P.B., Bernardo J., Mouga T., Valentão P. Can Phlorotannins Purified Extracts Constitute a Novel Pharmacological Alternative for Microbial Infections with Associated Inflammatory Conditions? *PLoS One.* 2012,7(2):e31145.
21. Plaza M., Cifuentes A., Ibanez E. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends Food Sci Technol.* 2008,19(1):31–9.
22. Li Y.-X., Wijesekara I., Li Y., Kim S.-K. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochem.* 2011,46(12):2219–24.
23. André F. Contribution a l' étude des algues marines du Portugal I. La flore. *Port Act Biol.* 1970,10:1–423.
24. André F. Algues du Portugal: liste préliminaire (I). *Rev Générale Bot.* 1961,68:443–56.
25. Sousa-Pinto I. The seaweed resources of Portugal. In: A.T. Critchley e M. Ohno (Eds.). *Seaweed resources of the world.* Japan International Cooperation Agency, Yokosuka. 1998. p. 176–84.
26. Araújo R., Bárbara I., Tibaldo M., Berecibar E., Tapia P.D., Pereira R., Santos R., Pinto I.S. Checklist of benthic marine algae and cyanobacteria of northern Portugal. *Botanica Marina.* 2008,52(1):24–46.
27. El-Said G.F., El-Sikaily A. Chemical composition of some seaweed from Mediterranean Sea coast, Egypt. *Environ Monit Assess.* 2013,185(7):6089–99.
28. Lahaye M. Marine Algae as Sources of Fibres : Determination of Soluble and Insoluble Dietary Fibre Contents in Some “ Sea Vegetables .” *J Sci Food Agric.* 1991,54(1971):587–94.
29. Dewick P.M. Secondary Metabolism: The Building Blocks and Contruction Mechanisms. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.* 3. ed. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kingdom; 2009. p. 7–38.
30. Burja A.M., Banaigs B., Abou-Mansour E., Burgess J.G., Wright P.C. Marine cyanobacteria - a prolific source of natural products. *Tetrahedron.* 2001,57(46):9347–77.
31. Lopes G., Sousa C., Valentão P., Andrade P.B. Sterols in Algae and Health. In: Hernández-Ledesma B, Herrero M, editors. *Bioactive Compounds from Marine Foods.* Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd; 2013. p. 173–91.
32. Rodríguez-Bernaldo de Quirós A., Lage-Yusty M.A., López-Hernández J. Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chem.* 2010,121(2):634–8.
33. Sánchez-Machado D.I., López-Cervantes J., López-Hernández J., Paseiro-Losada P. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.* 2004,85(3):439–44.
34. Onofrejová L., Vasícková J., Klejdus B., Stratil P., Misurcová L., Krácmár S., Kopecký J., Vacek J. Bioactive phenols in algae: the application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J Pharm Biomed Anal.* 2010,51(2):464–70.
35. Geiselman J.A., McConnell O.J. Polyphenols in brown algae *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*: Chemical defenses against the marine herbivorous snail, *Littorina littorea*. *J Chem Ecol.*

1981,7(6):1115–33.

36. Connan S., Deslandes E., Gall E.A. Influence of day–night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *J Exp Mar Bio Ecol.* 2007,349(2):359–69.
37. Amsler C.D., Fairhead V.A. Defensive and Sensory Chemical Ecology of Brown Algae. *Advances in Botanical Research.* 2005. p. 1–91.
38. Hay M.E. Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Ann Rev Mar Sci.* 2009,1:193–212.
39. Nagai H., Yasumoto T., Hokama Y. Manauealides, some of the causative agents of a red alga *Gracilaria coronopifolia* poisoning in Hawaii. *J Nat Prod. American Chemical Society;* 1997,60(9):925–8.
40. Miyashita K., Mikami N., Hosokawa M. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review. *J Funct Foods.* 2013,5(4):1507–17.
41. Madhusudan C., Manoj S., Rahul K., Rishi C.M. Seaweeds: A diet with nutritional, medicinal and industrial value. *Res J Med Palnt.* 2011,5:153–7.
42. Mohamed S., Hashim S.N., Rahman H.A. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci Technol.* 2012,23(2):83–96.
43. Balboa E.M., Conde E., Moure A., Falqué E., Domínguez H. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem.* 2013,138(2-3):1764–85.
44. Balasundram N., Sundram K., Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006,99(1):191–203.
45. Boulekbache-Makhlouf L., Slimani S., Madani K. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Ind Crops Prod.* 2013,41:85–9.
46. Gupta S., Abu-ghannam N. Bioactive Potential and Possible Health Effects of Edible Brown Seaweeds. *Trends Food Sci Technol.* 2011,22(6):315–26.
47. Nomura M., Kamogawa H., Susanto E., Kawagoe C., Yasui H., Saga N., Hosokawa M., Miyashita K. Seasonal variations of total lipids, fatty acid composition, and fucoxanthin contents of *Sargassum horneri* (Turner) and *Cystoseira hakodatensis* (Yendo) from the northern seashore of Japan. *J Appl Phycol.* 2012,25(4):1159–69.
48. Dhar M.K., Koul A., Kaul S. Farnesyl pyrophosphate synthase: a key enzyme in isoprenoid biosynthetic pathway and potential molecular target for drug development. *N Biotechnol.* 2013,30(2):114–23.
49. Manzo E., Ciavatta M.L., Bakkas S., Villani G., Varcamonti M., Zanfardino A., Gavagnin M. Diterpene content of the alga *Dictyota ciliolata* from a Moroccan lagoon. *Phytochem Lett.* 2009,2(4):211–5.
50. Sánchez-Machado D.I., López-Hernández J., Paseiro-Losada P., López-Cervantes J. An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomed Chromatogr.* 2004,18(3):183–90.
51. Lee S.-H., Jeon Y.-J. Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. *Fitoterapia.* 2013,86:129–36.
52. Vermerris W., Nicholson R. *Phenolic Compound Biochemistry.* USA: Springer; 2006.

53. Randhir R., Lin Y.T., Shetty K. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2004,13(3):295–307.
54. Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004,79(5):727–47.
55. Sabeena Farvin K.H., Jacobsen C. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chem.* 2013,138(2-3):1670–81.
56. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev.* 1998,56(11):317–33.
57. Machu L., Misurcova L., Ambrozova J.V., Orsavova J., Mlcek J., Sochor J., Jurikova T. Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules. Multidisciplinary Digital Publishing Institute;* 2015,20(1):1118–33.
58. Yoshie Y., Wang W., Petillo D., Suzuki T. Distribution of catechins in Japanese seaweeds. *Fish Sci.* 2000,66(5):998–1000.
59. Khanbabaee K., Ree T. Van. Tannins : Classification and Definition. *Nat Prod Rep.* 2001,18:641–9.
60. Thomas N.V., Kim S.-K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2011,32(3):325–35.
61. Pereira L. MACOI - Portuguese Seaweeds Website. World-wide Electronic Publication. IMAR, Department of Life Sciences, University of Coimbra. <http://macoi.ci.uc.pt/> (October 20, 2015).
62. Veiga P., Torres a C., Rubal M., Troncoso J., Sousa-Pinto I. The invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Ochrophyta) along the north coast of Portugal: distribution model versus field observations. *Mar Pollut Bull.* 2014,84:363–5.
63. Park N.-H., Choi J.-S., Hwang S.-Y., Kim Y.-C., Hong Y.-K., Cho K., Choi I. Antimicrobial activities of stearidonic and gamma-linolenic acids from the green seaweed *Enteromorpha linza* against several oral pathogenic bacteria. *Bot Stud.* 2013,54(1):39.
64. Wang S., Li Y., White W., Lu J. Extracts from New Zealand *Undaria pinnatifida* Containing Fucoxanthin as Potential Functional Biomaterials against Cancer in Vitro. *J Funct Biomater.* 2014,5(2):29–42.
65. Holdt S.L., Kraan S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J Appl Phycol.* 2011,23(3):543–97.
66. Lee Y.S., Shin K.H., Kim B.-K., Lee S. Anti-diabetic activities of fucosterol from *Pelvetia siliquosa*. *Arch Pharm Res.* 2004,27(11):1120–2.
67. Trincherio J., Ponce N.M.A., Córdoba O.L., Flores M.L., Pampuro S., Stortz C.A., Salomón H., Turk G. Antiretroviral activity of fucoidans extracted from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*. *Phytother Res.* 2009,23(5):707–12.
68. Ermakova S., Sokolova R., Kim S.-M., Um B.-H., Isakov V., Zvyagintseva T. Fucoidans from brown seaweeds *Sargassum hornery*, *Eclonia cava*, *Costaria costata*: structural characteristics and anticancer activity. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011,164(6):841–50.
69. Yang C., Chung D., Shin I.-S., Lee H., Kim J., Lee Y., You S. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Int J Biol Macromol.* 2008,43(5):433–7.

70. Kim K.-H., Kim Y.-W., Kim H.B., Lee B.J., Lee D.S. Anti-apoptotic activity of laminarin polysaccharides and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Biotechnol Lett.* 2006,28(6):439–46.
71. Abrantes J.L., Barbosa J., Cavalcanti D., Pereira R.C., Frederico Fontes C.L., Teixeira V.L., Moreno Souza T.L., Paixão I.C.P. The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae *Dictyota pfaffii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. *Planta Med.* York; 2010,76(4):339–44.
72. Liu R.H., Finley J. Potential cell culture models for antioxidant research. *J Agric Food Chem.* 2005,53(10):4311–4.
73. Parthiban C., Saranya C., Girija K., Hemalatha A., Suresh M., Anantharaman P. Evaluation of antioxidant properties of some selected seaweeds from Tuticorin coast. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2013,2(9):64–73.
74. Pisoschi A.M., Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015,97:55–74.
75. Poljsak B., Šuput D., Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2013,2013:11.
76. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007,39(1):44–84.
77. Magder S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care.* 2006,10(1):208.
78. Siti H.N., Kamisah Y., Kamsiah J. The Role of Oxidative Stress, Antioxidants and Vascular Inflammation in Cardiovascular Disease (A Review). *Vascul Pharmacol.* 2015,71:40–56.
79. Griendling K.K., FitzGerald G. a. Oxidative Stress and Cardiovascular Injury Part I: Basic Mechanisms and In Vivo Monitoring of ROS. *Circulation.* 2003,108(16):1912–6.
80. Rochette L., Lorin J., Zeller M., Guillard J.-C., Lorgis L., Cottin Y., Vergely C. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther.* 2013,140(3):239–57.
81. Ďuračková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010,59(4):459–69.
82. Santos S.A.O. Phenolic compounds from forest industrial by- products. Universidade de Aveiro; 2012.
83. Moon J.-K., Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem.* 2009,57(5):1655–66.
84. Ozcelik B., Lee J.H., Min D.B. Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J Food Sci.* 2003,68(2):487–90.
85. Kadam S.U., Tiwari B.K., O'Donnell C.P. Application of novel extraction technologies for bioactives from marine algae. *J Agric Food Chem.* 2013,61(20):4667–75.
86. Wang L., Weller C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol.* 2006,17(6):300–12.
87. Ramluckan K., Moodley K.G., Bux F. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel.* 2014,116:103–8.

88. Luque de Castro M., García-Ayuso L.. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal Chim Acta*. 1998,369(1-2):1–10.
89. Ramos P. a B., Guerra A.R., Guerreiro O., Freire C.S.R., Silva A.M.S., Duarte M.F., Silvestre A.J.D. Lipophilic extracts of *cynara cardunculus* L. var. *altilis* (DC): A source of valuable bioactive terpenic compounds. *J Agric Food Chem*. 2013,61:8420–9.
90. Vilela C., Santos S. a O., Coelho D., Silva A.M.S., Freire C.S.R., Neto C.P., Silvestre A.J.D. Screening of lipophilic and phenolic extractives from different morphological parts of *Halimione portulacoides*. *Ind Crops Prod*. 2014,52:373–9.
91. M. Naczki, R. Amarowicz, R. Zadernowski, F. Shahidi. Antioxidant Capacity of Phenolics from Canola Hulls as Affected by Different Solvents. In: Shahidi F, Ho C-T, editors. *Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products*. 2005. p. 57–66.
92. Harukaze A., Murata M., Homma S. Analyses of Free and Bound Phenolics in Rice. *Food Sci Technol Res*. 1999,5(1):74–9.
93. Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 2013,18(2):2328–75.
94. Royal Society of Chemistry: Classic Kit: Soxhlet extractor. <http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2007/September/ClassicKitSoxhletExtractor.asp> (30 de Setembro de 2015).
95. Herrero M., del Pilar Sánchez-Camargo A., Cifuentes A., Ibáñez E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TrAC Trends Anal Chem*. 2015,.
96. Billakanti J.M., Catchpole O.J., Fenton T.A., Mitchell K.A., MacKenzie A.D. Enzyme-assisted extraction of fucoxanthin and lipids containing polyunsaturated fatty acids from *Undaria pinnatifida* using dimethyl ether and ethanol. *Process Biochem*. 2013,48(12):1999–2008.
97. Mitra S. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Winefordner JD, editor. New Jersey, Canada: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken; 2003.
98. Plaza M., Santoyo S., Jaime L., Avalo B., Cifuentes A., Reglero G., García-Blairsy Reina G., Señoráns F.J., Ibáñez E. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT - Food Sci Technol*. 2012,46(1):245–53.
99. Sánchez-Camargo A. del P., Montero L., Stiger-Pouvreau V., Tanniou A., Cifuentes A., Herrero M., Ibáñez E. Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chem*. 2016,192:67–74.
100. Heo S.-J., Park E.-J., Lee K.-W., Jeon Y.-J. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol*. 2005,96(14):1613–23.
101. Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R. Principles of Instrumental Analysis. Canada: Thomson Brooks/Cole; 2006.
102. Freire C.S. da R.B. *Eucalyptus globulus* Low Molecular Weight Organic Compounds: Behavior During Wood Kraft Pulping and Pulp Bleaching. Universidade de Aveiro; 2002.
103. Sparkman O.D., Penton Z.E., Kitson F.G. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. ed. Academic Press Inc., San Diego, USA; 2011.
104. McMahon G. *Analytical Instrumentation: A Guide to Laboratory, Portable and Miniaturized*

- Instruments. Ireland: John Wiley & Sons; 2008.
105. Karasek F.W., Clement R.E. Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Techniques. Ontario, Canada: Elsevier; 1988.
 106. Guliyev V.B., Gul M., Yildirim A. Hippophae rhamnoides L.: chromatographic methods to determine chemical composition, use in traditional medicine and pharmacological effects. J Chromatogr B. 2004,812:291–307.
 107. Freire CSR, Silvestre AJD, Neto CP. Identification of New Hydroxy Fatty Acids and Ferulic Acid Esters in the Wood of Eucalyptus globulus. Holzforschung. 2002,56(2):143–9.
 108. Koivikko R., Loponen J., Pihlaja K., Jormalainen V. High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga Fucus vesiculosus. Phytochem Anal. 2007,18(4):326–32.
 109. Touati R., Santos S.A.O., Rocha S.M., Belhamel K., Silvestre A.J.D. The potential of cork from Quercus suber L. grown in Algeria as a source of bioactive lipophilic and phenolic compounds. Ind Crops Prod. 2015,76:936–45.
 110. Murphy R.C. Mass Spectrometry of lipids, in Handbook of Lipid Research, Vol. 7. Snyder, F. (Ed.), Plenum Press, New York. 1993.
 111. Xu Z., Godber J.S. Purification and Identification of Components of γ -Oryzanol in Rice Bran Oil. J Agric Food Chem. American Chemical Society; 1999,47(7):2724–8.
 112. Ginneken V.J. van, Helsper J.P., Visser W. de, Keulen H. van, Brandenburg W.A. Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from North Atlantic and tropical seas. Lipids Health Dis. 2011,10:104.
 113. Li X., Fan X., Han L., Lou Q. Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. Phytochemistry. 2002,59(2):157–61.
 114. Dawczynski C., Schubert R., Jahreis G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. Food Chem. 2007,103(3):891–9.
 115. Kumari P., Kumar M., Gupta V., Reddy C.R.K., Jha B. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. Food Chem. 2010,120(3):749–57.
 116. Rontani J.-F., Aubert C. Trimethylsilyl transfer during electron ionization mass spectral fragmentation of some ω -hydroxycarboxylic and ω -dicarboxylic acid trimethylsilyl derivatives and the effect of chain length. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004,18(17):1889–95.
 117. AOCS Lipid Library - Part 2. Derivatives Other than Nicotines. <http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=39523> (12 de Novembro de 2015).
 118. Watson J.T., Sparkman O.D. Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation. East Lansing, Michigan; 2008.
 119. Combaut G. GC-MS of Plant Sterol Analysis, in Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Linskens HF, Jackson JF, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin; 1986. 121–133 p.
 120. Kitson F.G., Larsen B.S., McEwen C.N. Gas Chromatography and Mass Spectrometry- A practical Guide. San Diego, USA: Academic Press Inc; 1996. 347–350 p.
 121. Diekman J., Djerassi C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXXV. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl esters. J Org Chem. American Chemical Society; 1967,32(4):1005–12.

122. Gustafsson J.A., Ryhage R., Sjövall J., Moriarty R.M. Migrations of the trimethylsilyl group upon electron impact in steroids. *J Am Chem Soc. American Chemical Society*; 1969,91(5):1234–6.
123. Brooks C.J.W. Some Aspects of Mass Spectrometry in Research on Steroids. *Philos Trans R Soc London A*. 1979,293:53–67.
124. Easa H.S. al, Kornprobst J.-M., Rizk A.M. Major Sterol Composition of Some Algae From Qatar. *Phytochemistry*. 1995,39(2):373–4.
125. Chirinos R., Betalleluz-Pallardel I., Huamán A., Arbizu C., Pedreschi R., Campos D. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chem*. 2009,113(4):1243–51.
126. Mitra S.P. UV-Vis spectrophotometry plus HPLC to measure the level of catechin/poly – phenolics and to understand its oxidized conditions in commercially available green and black teas. 2014,53(October):1255–62.
127. Roleda M.Y., Clayton M.N., Wiencke C. Screening capacity of UV-absorbing compounds in spores of Arctic Laminariales. *J Exp Mar Bio Ecol*. 2006,338(1):123–33.
128. Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Zhang H., Niu X. Structural studies on a novel fucogalactan sulfate extracted from the brown seaweed *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol*. 2010,47(2):126–31.
129. Vishchuk O.S., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydr Res*. 2011,346(17):2769–76.
130. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydr Res*. 2002,337(8):719–30.
131. Kumar N.S., Rajapaksha M. Separation of catechin constituents from five tea cultivars using high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A*. 2005,1083(1-2):223–8.
132. Parys S., Kehraus S., Krick A., Glombitza K.W., Carmeli S., Klimo K., Gerhäuser C., König G.M. In vitro chemopreventive potential of fucophlorethols from the brown alga *Fucus vesiculosus* L. by anti-oxidant activity and inhibition of selected cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry. Elsevier Ltd*; 2010,71(2-3):221–9.
133. Yotsu-Yamashita M., Kondo S., Segawa S., Lin Y.-C., Toyohara H., Ito H., Konoki K., Cho Y., Uchida T. Isolation and Structural Determination of Two Novel Phlorotannins from the Brown Alga *Ecklonia kurome* Okamura, and Their Radical Scavenging Activities. *Mar Drugs*. 2013,11(1):165–83.
134. Ale M.T., Maruyama H., Tamauchi H., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 in vitro. *Mar Drugs. Molecular Diversity Preservation International*; 2011,9(12):2605–21.
135. Rocha H.A.O., Moraes F.A., Trindade E.S., Franco C.R.C., Torquato R.J.S., Veiga S.S., Valente A.P., Mourão P.A.S., Leite E.L., Nader H.B., Dietrich C.P. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? *J Biol Chem*. 2005,280(50):41278–88.
136. Jégou C., Kervarec N., Cérantola S., Bihannic I., Stiger-Pouvreau V. NMR use to quantify phlorotannins: the case of *Cystoseira tamariscifolia*, a phloroglucinol-producing brown macroalga in Brittany (France). *Talanta*. 2015,135:1–6.

8. Anexos

Tabela 14 - Espécies de macroalgas castanhas existentes ao longo da costa portuguesa (15,26).

Espécies do norte (frias)	Espécies sul (quentes)	Espécies endémicas	Espécies exóticas
<i>Ascophyllum nodosum</i>	<i>Cutleria adspersa</i>	<i>Bifurcaria bifurcata</i>	<i>Colpomenia peregrina</i>
<i>Chorda filum</i>	<i>Halopteris filicina</i>	<i>Cystoseira baccata</i>	<i>Sargassum muticum</i>
<i>Desmarestia aculeata</i>	<i>Padina pavonia</i>	<i>Cystoseira nodicaulis</i>	<i>Undaria pinnatifida</i>
<i>Desmarestia ligulata</i>		<i>Laminaria ochroleuca</i>	
<i>Ectocarpus fasciculatus</i>		<i>Phyllariopsis brevipes</i> ssp. <i>pseudopurpurascens</i>	
<i>Elachista flaccida</i>			
<i>Elachista fucicola</i>			
<i>Elachista scutulata</i>			
<i>Herponema velutinum</i>			
<i>Fucus ceranoides</i>			
<i>Fucus serratus</i>			
<i>Himanthalia elongata</i>			
<i>Laminaria hyperborea</i>			
<i>Litosiphon laminariae</i>			
<i>Pelvetia canaliculata</i>			
<i>Petalonia zosterifolia</i>			
<i>Pylaiella littoralis</i>			
<i>Saccharina latissima</i>			
<i>Spongonema tomentosum</i>			
<i>Vaucheria velutina</i>			
<i>Vaucheria coronata</i>			

Cromatogramas resultantes dos extratos em diclorometano das macroalgas *L. ochroleuca* e *U. pinnatifida*.

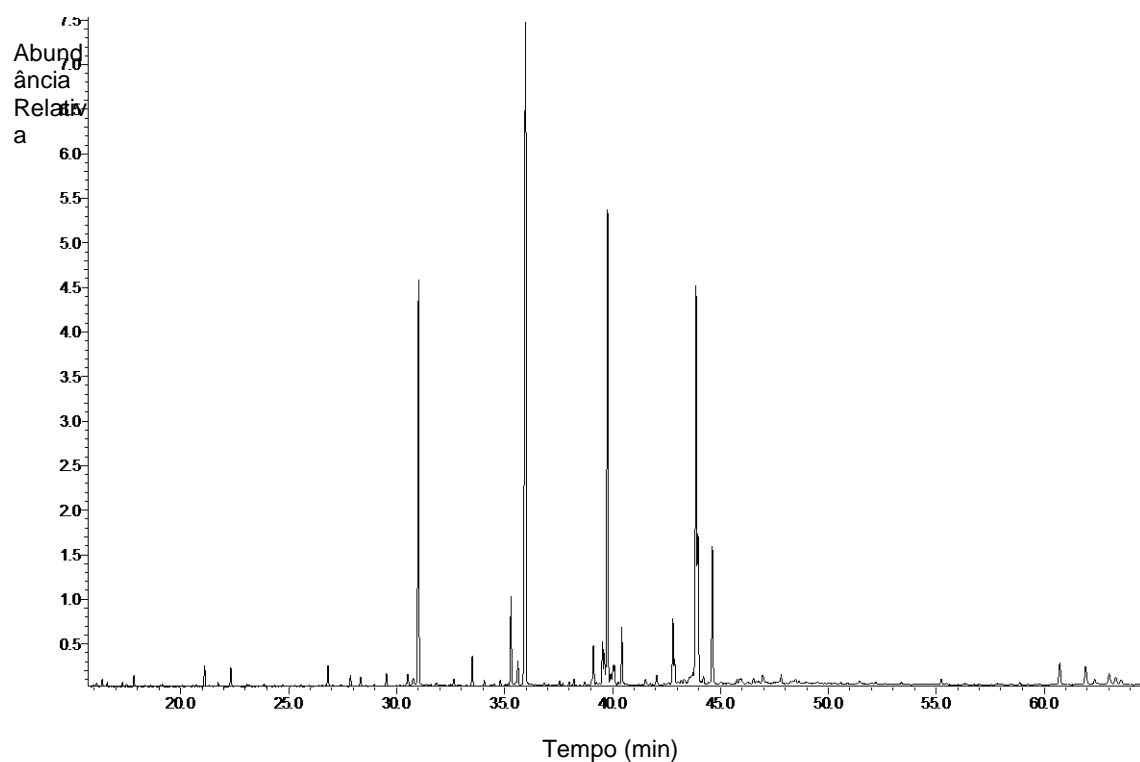


Figura 35 – Cromatograma do extrato em diclorometano derivatizado da macroalga *L. ochroleuca*.

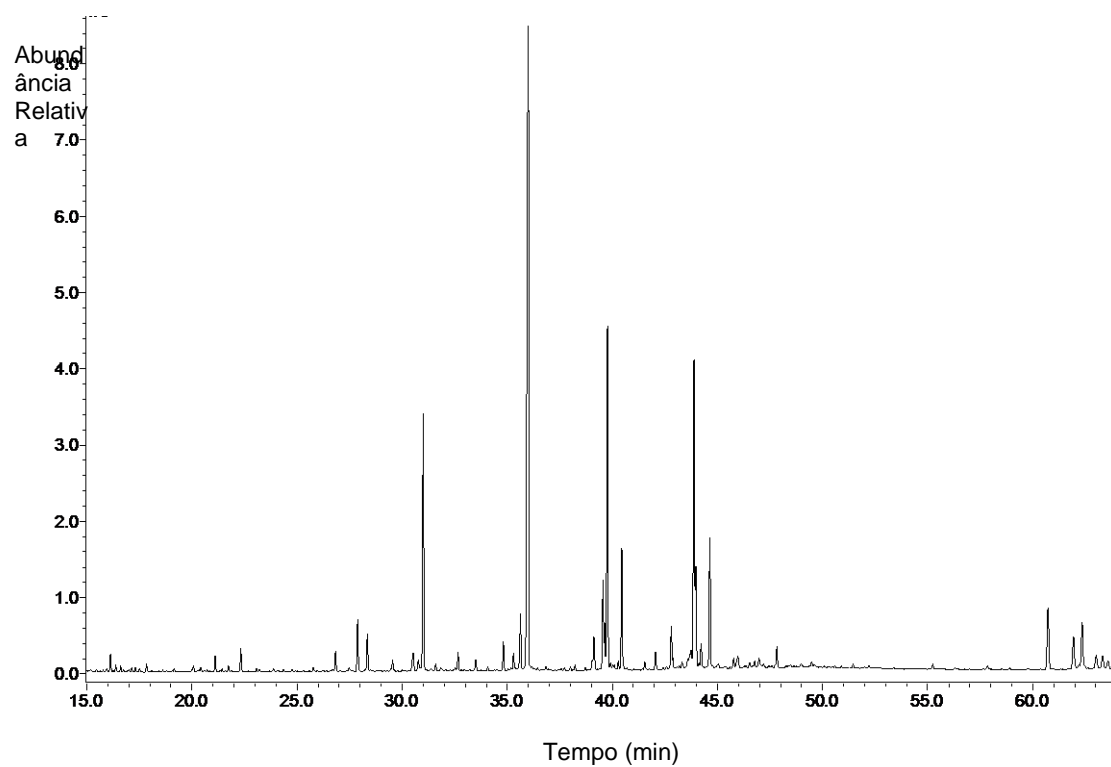


Figura 36 – Cromatograma do extrato em diclorometano derivatizado da macroalga *U. pinnatifida*.